В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин

**ПРАКТИКУМ ПО ЭНЗИМОЛОГИИ**

**Учебно-методическое пособие**

ПЕНЗА

2007

Печатается по решению редакционно-издательского совета Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского

УДК 577.1

Соловьев В. Б. Практикум по энзимологии: учебно-методическое пособие / В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин. – Пенза, 2007. – 52 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Биохимия».

© Соловьев В. Б., 2007

© Генгин М. Т., 2007

© ПГПУ им. В. Г. Белинского, 2007

**Введение**

Настоящее пособие предназначено для ознакомления студентов как с классическими методами исследования ферментов, так и с современными, высокочувствительными аналитическими методами, использующими ферменты как инструменты исследований. Пособие состоит из пяти разделов:

1. Методы определения активности ферментов.

2. Изучение кинетических параметров ферментативных реакций.

3. Методы выделения и очистки ферментов.

4. Изучение субклеточной локализации ферментов.

5. Использование ферментов в качестве аналитических реагентов.

Все разделы «Практикума» имеют самостоятельные задачи, однако требования, предъявляемые к студентам, остаются одинаковыми. Каждая предлагаемая работа представляет собой небольшое экспериментальное исследование. При выполнении любой из них студент должен самостоятельно подготовить все нужные растворы, освоить необходимые методы исследования, провести эксперимент и оформить результаты в виде отчета, иллюстрируя полученные данные таблицами и графиками.

Уровень используемых методических приемов соответствует требованиям современной науки. При необходимости в описании работы приводятся краткие теоретические сведения. Все работы, включенные в «Практикум», неоднократно выполнялись студентами.

Все замечания и пожелания будут приняты авторами с благодарностью.

**Работа 1. Титрометрическое определение активности каталазы**

Оборудование и реактивы: кипящая водяная баня; пипетки на 5, 10, 20 и 25 мл; цилиндры измерительные с носиком на 10 и 25 мл; колба мерная на 100 мл; колбы конические на 200 мл; ступка с пестиком фарфоровые; перманганат калия (0,1 н); серная кислота (10 %); карбонат натрия; пероксид водорода (0,1 н); свежий растительный материал (картофель или морковь).

2 г сырого картофеля (или моркови) растирают в ступке, постепенно добавляя 2-3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике шпателя карбонат натрия до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу и доводят водой до объема 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30 минут, после чего ее фильтруют. Далее определяют активность по схеме (2 опытных пробы и 2 контрольных):

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 20 мл вытяжки фермента | 20 мл вытяжки фермента |
|  –  | Нагревание 10 мин на кипящей водяной бане |
| 25 мл 0,1 н перекиси водорода | 25 мл 0,1 н перекиси водорода |
| Инкубация 30 минут при комнатной температуре |
| 5 мл 10 % H2SO4 | 5 мл 10 % H2SO4 |

Опыт и контроль титруют 0,1 н. раствором перманганата калия (до образования устойчивого в течение примерно 1 мин бледно-розового окрашивания). Отмечают количество раствора перманганата калия, пошедшего на титрование оставшегося (после ферментативного разложения) пероксида водорода в опытной колбе и на титрование всего пероксида водорода в контрольной. По разности между опытным и контрольным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода.

Расчет ведут в соответствии с уравнением реакции:

5H2O2 + 2KMnO4 + 3H2SO4 → 2MnSO4 + K2SO4 + 5O2 + 8H2O,

согласно которому 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода.

Пример расчета: из 1,25 г моркови приготовлена вытяжка каталазы объемом 100 мл: на титрование опытной пробы затрачено 15,5 мл, контрольной 30,2 мл 0,1 н раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода в пробе эквивалентно (30,2 – 15,5) 14,7 мл 0,1 н. раствора перманганата калия и, следовательно, равно (14,7∙1,7) 24,99 мг. Значит, в 1 г сырой моркови содержится количество каталазы, способное разложить = 99, 96 мг пероксида водорода, а за 1 мин – (99,96:30) 3,33 мг. Так как 1 мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то в 1 г моркови присутствует (3,33:0,034) 100 Е каталазы.

Содержание отчета

1. Рассчитайте содержание каталазы в исследуемом материале.

2. Напишите систематическое название данного фермента, его код по систематическому каталогу и опишите его биологическую роль.

**Работа 2. Фотометрическое определение активности трипсина**

Оборудование и реактивы: пробирки, пипетки на 10 мл, паранитроанилин, 100 мкМ раствор бензоил-аргинин-пара-нитроанилида (БАПНА) в фосфатном буфере \*, раствор трипсина (10 мкг/мл) \*, 1 н HCl, 0,0025 н HCl, ацетон.

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

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

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

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № пробирки | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 100 мкМ п‑НА, мл | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 |
| Дист. Вода, мл | 5 | 4,5 | 4 | 3,5 | 3 | 2,5 | 2 | 1,5 | 1 | 0,5 | 0 |

В пробах определяют величину оптической плотности на фотоэлектроколориметре КФК-3 (или КФК-2) при 364 нм и строят график зависимости величины оптической плотности от концентрации п-НА.

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

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 1,6 мл раствора БАПНА | 1,6 мл раствора БАПНА |
|  –  | 0,7 мл 1 н HCl |
| Преинкубация в термостате при 37°С в течении 10 минут |
| 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) | 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) |
|  Инкубация в термостате при 37°С в течении 30 минут |
| 0,7 мл 1 н HCl | – |

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

Содержание отчета

1. Калибровочный график по пара-нитроанилину:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Конц.п-НА |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Опт.плотность |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

2. Рассчитайте активность фермента.

3. Напишите рекомендуемое систематическое название данного фермента, его код по систематическому каталогу и опишите его биологическую роль.

**Работа 3. Флюориметрическое определение активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы**

Оборудование и реактивы: пробирки, автоматическая пипетка, гомогенизатор, набор для определения фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ‑КП): откалиброванная по спирту пипетка на 10 мкл, пипетка на 2 мл, стеклянная воронка, цилиндр на 250 мл с притертой пробкой, гомогенизатор, 50 мМ натрий-ацетатный буфер с 50 мМ NaCl (рН 5,6), спиртовой раствор ФМСФ\*, раствор дансил-фен-лей-арг (DNS-FLR)\*\*, 1 н HCl, хлороформ, печень животного, реактив Фолина, реактивы А и В для метода Лоури.

\* Приготовление раствора ФМСФ (25 мМ): 22 мг ФМСФ растворяют в 5 мл дважды перегнанного этилового спирта.

\*\* Приготовление раствора DNS-FLR: К 1 мг DNS-FLR дозатором прибавляют 50 мкл метанола, а затем – 7,5 мл натрий-ацетатного буфера рН=5,6.

200 мг печени гомогенизируют на льду в 10 мл буфера. Гомогенат хранят на льду. Пробирки каждой параллели (3 опытных и 3 контрольных) помещают, предварительно подписав, в один штатив. Раскапывают реактивы по следующей схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| Опыт ( – ) | Контроль ( + ) |
| 150 мкл буфера | 140 мкл буфера |
| 50 мкл гомогената | 50 мкл гомогената |
| – | 10 мкл раствора ФМСФ (добавляют специально откалиброванной стеклянной пипеткой) |
| Преинкубация 8 минут при 37 °С |
| 50 мкл раствора DNS-FLR | 50 мкл раствора DNS-FLR |
| Инкубация 30 мин при 37 °С |
| 50 мкл 1 н HCl | 50 мкл 1 н HCl |

После окончания реакции в каждую пробирку добавляют 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивают штатив в течении 60 сек. Затем пробирки помещают в центрифуги и центрифугируют их 10 мин при 1000 об/мин для разделения фаз. Отбирают хлороформную фракцию и измеряют величину флюоресценции на флюориметре (λех=360 нм, λем=530 нм). Количество белка в пробе определяют по Лоури (см. примечание 1) Активность ФМСФ-КН рассчитывают как разность флюоресценции проб не содержащих ФМСФ и проб, содержащих ФМСФ, и выражают в нМ продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Формула для расчета активности:

а =

Содержание отчета

1. Рассчитайте активность фермента в исследуемом материале.

2. Опишите фермент и его предполагаемую биологическую роль. Напишите предполагаемый систематический код фермента.

**Работа 4. Определение кинетических параметров реакции гидролиза трипсином бензоил-аргинин-пара-нитроанилида методами Лайнуйвера-Бэрка и Эйзенталя-Корниш-Боудена. Определение типа ингибирования трипсина высокомолекулярным ингибитором трипсина из бычьего легкого**

Оборудование и реактивы: пробирки, пипетки на 10 мл, растворы БАПНА следующих концентраций: 1 мМ, 0,75 мМ, 0,5 мМ, 0,25 мМ, 0,125 мМ, раствор трипсина (10 мкг/мл), раствор ингибитора трипсина\* (10 мкг/мл), 1 н HCl.

\* Приготовление раствора ингибитора: 1 мг ингибитора растворяют в 1 мл 0,0025 н HCl. Рабочий раствор готовят непосредственно перед опытом путем стократного разведения исходного раствора дистиллированной водой.

Для определения Vmax и Км данной реакции, а также типа ингибирования трипсина строят график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата без ингибитора и в присутствии ингибитора (в системах координат Лайнуйвера-Берка и Эйзенталя-Корниш-Боудена). Для каждой концентрации субстрата выставляют по 4 пробирки: 2 опытных и 2 контрольных. Схема определения активности трипсина.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 1,6 мл раствора БАПНА | 1,6 мл раствора БАПНА |
|  –  | 0,7 мл 1 н HCl |
| Преинкубация в термостате при 37 °С в течении 10 минут |
| 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) | 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) |
|  Инкубация в термостате при 37 °С в течении 30 минут |
| 0,7 мл 1 н HCl | – |

Активность фермента в присутствии ингибитора определяют по схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 1,6 мл раствора БАПНА | 1,6 мл раствора БАПНА |
| 100 мкл раствора ингибитора трипсина (10 мкг/мл) | 100 мкл буфера |
| – | 0,7 мл 1 н HCl |
| Преинкубация в термостате при 37°С в течении 10 минут |
| 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) | 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) |
|  Инкубация в термостате при 37°С в течении 30 минут |
| 0,7 мл 1 н HCl | – |

Измеряют оптическую плотность при 364 нм. Удельную активность фермента выражают в мкМ п-НА, отщепленного 1 мкг трипсина за 1 мин, по калибровочной кривой. Графики зависимости строят на миллиметровой бумаге.

Содержание отчета

1. Рассчитайте кинетические параметры и определите тип ингибирования способом Лайнуйвера-Бэрка.

2. Рассчитайте кинетические параметры и определите тип ингибирования способом Эйзенталя и Корниш-Боудена.

**Работа 5. Изучение влияние температуры и рН среды на активность трипсина**

Оборудование и реактивы: пробирки, пипетки на 10 мл, две водяные бани, 1 мМ растворы БАПНА в 0,05 М фосфатном буфере со следующими значениями рН: 9, 7.6, 6, 5, раствор трипсина (10 мкг/мл), 1 н HCl.

1. Для изучения влияния рН среды на активность трипсина пользуются растворами БАПНА с разными значениями рН, по 2 опыта и 2 контроля в каждой параллели. Активность определяют по схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 1,6 мл раствора БАПНА | 1,6 мл раствора БАПНА |
|  –  | 0,7 мл 1 н HCl |
| Преинкубация в термостате при 37 °С в течении 10 минут |
| 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) | 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) |
|  Инкубация в термостате при 37 °С в течении 30 минут |
| 0,7 мл 1 н HCl | – |

Измеряют оптическую плотность при 364 нм. Удельную активность фермента выражают в мкМ п-НА, отщепленного 1 мкг трипсина за 1 мин, по калибровочной кривой. Строят график зависимости активности трипсина от рН среды.

2. Для изучения влияния температуры среды на активность трипсина пользуются этой же схемой, используя раствор БАПНА со значением рН=7,6, но пробирки инкубируют:

а) при комнатной температуре;

б) при 4 °С (Инкубировать в холодильнике. Использовать предварительно охлажденные растворы!);

в) на водяной бане при t=55 °С;

г) на водяной бане при t=75 °С.

Содержание отчета

1. График зависимости активности трипсина от рН среды.

2. График зависимости активности трипсина от температуры.

**Работа 6. Определение константы ингибирования трипсина высокомолекулярным ингибитором трипсина из бычьего легкого методом Диксона**

Оборудование и реактивы: пробирки, пипетки на 10 мл, 1 мМ раствор БАПНА, раствор трипсина (10 мкг/мл), растворы ингибитора трипсина следующих концентраций:10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1 мкг/мл\*, 1 н HCl.

\* Приготовление растворов ингибитора: 1 мг ингибитора растворяют в 1 мл 0,0025 н HCl. Получают маточный раствор с концентрацией 1 мг/мл. Рабочие растворы готовят непосредственно перед опытом путем разведения маточного раствора в необходимом соотношении дистиллированной водой.

Определяют активность трипсина при различных концентрациях субстрата и ингибитора. Для каждой концентрации ингибитора выставляют по 4 пробирки: 2 опытных и 2 контрольных. Схема определения активности трипсина.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 1,6 мл раствора БАПНА | 1,6 мл раствора БАПНА |
| 100 мкл раствора ингибитора трипсина | 100 мкл буфера |
| – | 0,7 мл 1 н HCl |
| Преинкубация в термостате при 37 °С в течении 10 минут |
| 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) | 0,5 мл раствора трипсина (10 мкг/мл) |
|  Инкубация в термостате при 37 °С в течении 30 минут |
| 0,7 мл 1 н HCl | – |

Измеряют оптическую плотность при 364 нм. Удельную активность фермента выражают в мкМ п-НА, отщепленного 1 мкг трипсина за 1 мин, по калибровочной кривой. Графики зависимости обратной скорости от концентрации ингибитора и зависимости s/v от концентрации ингибитора строят на миллиметровой бумаге.

Содержание отчета

1. Определите константу ингибирования методом Диксона.

**Работа 7. Частичная очистка ФМСФ-КП из печени крыс фракционированием сульфатом аммония**

Оборудование и реактивы: пробирки, автоматическая пипетка, гомогенизатор, стеклянные стаканы на 50 и 100 мл, набор для определения фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ‑КП): откалиброванная по спирту пипетка на 10 мкл, пипетка на 2 мл, стеклянная воронка, цилиндр на 250 мл с притертой пробкой, гомогенизатор, 50 мМ натрий-ацетатный буфер с 50 мМ NaCl (рН 5,6), спиртовой раствор ФМСФ, раствор дансил-фен-лей-арг (DNS-FLR), 1 н HCl, хлороформ, кристаллический сульфат аммония, набор растворов для определения белка по Лоури, печень животного.

4 г печени животного гомогенизируют на льду в 20 мл буфера. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для удаления пленок. В пробирку отбирают 200 мкл центрифугированного гомогената и добавляют 3,8 мл буфера. Перешивают и помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка в гомогенате.

Все дальнейшие операции производят на льду. Измеряют объем оставшегося центрифугированного гомогената. Добавляют кристаллический сульфат аммония до достижения 10 % концентрации и тщательно перемешивают. Выпавший осадок отделяют центрифугированием при 4000 об/мин в течении 10 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают и измеряют объем. К осадку добавляют исходный буфер до полного растворения, затем разводят этим же буфером в 10 раз и помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка.

К надосадочной жидкости добавляют кристаллический сульфат аммония до достижения 20 % концентрации, центрифугируют, отделяют осадок, растворяют его в буфере, разводят в два раза буфером и помещают на лед. Повторяют операцию по высаливанию, добавляя сульфат аммония к надосадочной жидкости до достижения 60 % концентрации. Осадок, отделенный центрифугированием ресуспендируют в исходном буфере и разбавляют в десять раз. Во всех фракциях, гомогенате и конечном супернатанте определяют активность по следующей схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| Опыт ( – ) | Контроль ( + ) |
| 150 мкл буфера | 140 мкл буфера |
| 50 мкл гомогената | 50 мкл гомогената |
| – | 10 мкл раствора ФМСФ (добавляют специально откалиброванной стеклянной пипеткой) |
| Преинкубация 8 минут при 37°С |
| 50 мкл раствора DNS-FLR | 50 мкл раствора DNS-FLR |
| Инкубация 30 мин при 37°С |
| 50 мкл 1 н HCl | 50 мкл 1 н HCl |

После окончания реакции в каждую пробирку добавляют 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивают штатив в течение 60 сек. Затем пробы центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для разделения фаз. Отбирают хлороформную фракцию и измеряют величину флюоресценции на флюориметре (λех=360 нм, λем=530 нм). Количество белка в пробе определяют методом Лоури. Активность ФМСФ-КН рассчитывают как разность флюоресценции проб, не содержащих ФМСФ, и проб, содержащих ФМСФ, и выражают в нМ продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Формула для расчета активности:

а =

Содержание отчета

1. Определите степень очистки ФМСФ-КП.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракция | Гомогенат | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% | 60% |
| Активность |  |  |  |  |  |  |  |
| Степеньочистки | 100% |  |  |  |  |  |  |

**Работа 8. Частичная очистка ФМСФ-КП из печени крыс методом гель-фильтрации**

Оборудование и реактивы: пробирки, автоматическая пипетка, гомогенизатор, стеклянные стаканы на 50 и 100 мл, колонка для гель-фильтрации высотой 15 см, шприц, набор для определения фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ‑КП): откалиброванная по спирту пипетка на 10 мкл, пипетка на 2 мл, стеклянная воронка, цилиндр на 250 мл с притертой пробкой, гомогенизатор, 50 мМ натрий-ацетатный буфер с 50 мМ NaCl (рН 5,6), спиртовой раствор ФМСФ, раствор дансил-фен-лей-арг (DNS-FLR), 1 н HCl, хлороформ, сефадекс G‑75, 0,9% раствор NaCl, набор растворов для определения белка по Лоури, печень животного.

Сефадекс G-75 суспендируют в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды и оставляют для набухания на 3 часа. Затем перемешивают до однородной массы, дают отстояться. После оседания основной массы геля осторожно декантируют надосадочную жидкость с неосевшими обломками гранул. Суспендирование и последующую декантацию (отмучивание) повторяют 3-4 раза.

Колонку закрепляют в вертикальном положении, закрывают нижний конец пробкой со вставленным фитингом, помещают в основание колонки кружок фильтровальной бумаги, размер которого должен точно соответствовать внутреннему размеру колонки. Заливают примерно 2 мл раствора NaCl, дают заполниться фитингу и через воронку по стенке заливают густую суспензию геля. Открывают зажим колонки и дают раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы колонка не обсохла. Суспензию геля прибавляют до тех пор, пока его высота в колонке не достигнет нужного уровня, верхняя поверхность геля (стартовая зона) должна быть строго горизонтальной. Затем на поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги. Колонку промывают (уравновешивают) 1 объемом NаС1.

100 мг печени животного гомогенизируют на льду в 10 мл буфера. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для удаления пленок. Центрифугированный гомогенат помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка в гомогенате.

Открывают зажим колонки и сливают столб раствора NaCl, находящийся над сефадексом. Когда нижний мениск раствора коснется поверхности кружка фильтровальной бумаги, на колонку осторожно с помощью шприца наносят 1 мл центрифугированного гомогената. Дают образцу впитаться и затем быстро смывают остатки образца со стенок колонки тем же объёмом растворителя, снова дают впитаться. Затем заполняют колонку раствором NaCl, закрывают верхней пробкой с иглой и подсоединяют фитингом к сосуду, из которого поступает элюирующий раствор. С момента нанесения образца на колонку собирают 10 фракций объемом 1 мл.

Во 2, 4, 5, 6, 7, 9 фракциях и в разведенном гомогенате измеряют активность ФМСФ-КП по следующей схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| Опыт ( – ) | Контроль ( + ) |
| 150 мкл буфера | 140 мкл буфера |
| 50 мкл гомогената | 50 мкл гомогената |
| – | 10 мкл раствора ФМСФ (добавляют специально откалиброванной стеклянной пипеткой) |
| Преинкубация 8 минут при 37°С |
| 50 мкл раствора DNS-FLR | 50 мкл раствора DNS-FLR |
| Инкубация 30 мин при 37°С |
| 50 мкл 1 н HCl | 50 мкл 1 н HCl |

После окончания реакции в каждую пробирку добавляют 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивают штатив в течение 60 сек. Затем пробы центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для разделения фаз. Отбирают хлороформную фракцию и измеряют величину флюоресценции на флюориметре (λех=360 нм, λем=530 нм). Количество белка в пробе определяют по Лоури.

Активность ФМСФ-КН рассчитывают как разность флюоресценции проб не содержащих ФМСФ и проб, содержащих ФМСФ, и выражают в нМ продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Формула для расчета активности:

а =

Содержание отчета

1. Определите степень очистки ФМСФ-КП.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракция | Гомогенат | 2 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 |
| Активность |  |  |  |  |  |  |  |
| Степеньочистки | 100% |  |  |  |  |  |  |

**Работа 9. Частичная очистка ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы из печени методом ионообменной хроматографии (на карбоксиметилцеллюлозе)**

Оборудование и реактивы: пробирки; автоматическая пипетка; гомогенизатор; стеклянные стаканы на 50 и 100 мл; колонка для ионно-обменной хроматографии высотой 15 см; шприц; набор для определения фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ‑КП): откалиброванная по спирту пипетка на 10 мкл, пипетка на 2 мл, стеклянная воронка, цилиндр на 250 мл с притертой пробкой; гомогенизатор; 50 мМ натрий-ацетатный буфер с 50 мМ NaCl (рН 5,6); 0,05 М натрий-ацетатный буфер, содержащий 0,05 М NaCl, pH 3,5 и 6,0; спиртовой раствор ФМСФ, раствор дансил-фен-лей-арг (DNS-FLR); 1 н HCl, хлороформ; карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ); набор растворов для определения белка по Лоури, печень животного.

Колонку для хроматографии закрепляют в вертикальном положении, закрывают нижний конец пробкой со вставленным фитингом, помещают в основание колонки кружок фильтровальной бумаги, размер которого должен точно соответствовать внутреннему размеру колонки. Заливают примерно 2 мл раствора 0,05 М натрий-ацетатного буфера, содержащего 0,05 М NaCl, pH 3,5, дают заполниться фитингу и через воронку по стенке заливают густую суспензию КМЦ. Открывают зажим колонки и дают раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы колонка не обсохла. Суспензию КМЦ прибавляют до тех пор, пока его высота в колонке не достигнет нужного уровня, верхняя поверхность геля (стартовая зона) должна быть строго горизонтальной. Затем на поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги. Колонку промывают (уравновешивают) 20 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера, содержащего 0,05 М NaCl, pH 3,5.

2 г печени животного гомогенизируют на льду в 10 мл буфера. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для удаления пленок. В пробирку отбирают 200 мкл центрифугированного гомогената и добавляют 3,8 мл буфера. Перешивают и помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка в гомогенате.

Открывают зажим колонки и сливают столбик буфера, находящийся над гелем. Когда нижний мениск раствора коснется поверхности кружка фильтровальной бумаги, на колонку осторожно с помощью шприца наносят 1 мл центрифугированного гомогената. Дают образцу впитаться и затем быстро смывают остатки образца со стенок колонки тем же объёмом растворителя. Затем заполняют колонку раствором 0,05 М натрий-ацетатного буфера, содержащего 0,05 М NaCl, pH 3,5, закрывают верхней пробкой с иглой и подсоединяют фитингом к сосуду, из которого поступает элюирующий раствор. Для удаления несвязавшихся белков колонку промывают 50 мл буфера.

Затем фермент элюируют 0,05 М натрий-ацетатным буфером с 0,05 М NaCl, pH 6,0. С момента нанесения этого буфера на колонку собирают 10 фракций объемом 3 мл.

Во 2, 3, 4, 5, 6, 9 фракциях и в разведенном гомогенате измеряют активность ФМСФ-КП по следующей схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| Опыт ( – ) | Контроль ( + ) |
| 150 мкл буфера | 140 мкл буфера |
| 50 мкл гомогената | 50 мкл гомогената |
| – | 10 мкл раствора ФМСФ (добавляют специально откалиброванной стеклянной пипеткой) |
| Преинкубация 8 минут при 37 °С |
| 50 мкл раствора DNS-FLR | 50 мкл раствора DNS-FLR |
| Инкубация 30 мин при 37 °С |
| 50 мкл 1 н HCl | 50 мкл 1 н HCl |

После окончания реакции в каждую пробирку добавляют 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивают штатив в течение 60 сек. Затем пробы центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для разделения фаз. Отбирают хлороформную фракцию и измеряют величину флюоресценции на флюориметре (λех=360 нм, λем=530 нм). Количество белка в пробе определяют по Лоури. Активность ФМСФ-КН рассчитывают как разность флюоресценции проб не содержащих ФМСФ и проб, содержащих ФМСФ, и выражают в нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Формула для расчета активности:

а =

Содержание отчета

1. Определите степень очистки ФМСФ-КП

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракция | Гомогенат | 2 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 |
| Активность |  |  |  |  |  |  |  |
| Степеньочистки | 100 % |  |  |  |  |  |  |

**Работа 10. Частичная очистка ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы из печени методом ионообменной хроматографии (на диэтиламиноэтилцеллюлозе)**

Оборудование и реактивы: пробирки; автоматическая пипетка; гомогенизатор; стеклянные стаканы на 50 и 100 мл; колонка для ионно-обменной хроматографии высотой 15 см; шприц; набор для определения фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ‑КП): откалиброванная по спирту пипетка на 10 мкл, пипетка на 2 мл, стеклянная воронка, цилиндр на 250 мл с притертой пробкой; гомогенизатор; 50 мМ натрий-ацетатный буфер с 50 мМ NaCl (рН 5,6); 0,05 М натрий-ацетатный буфер, содержащий 0,05 М NaCl, pH 6,0; 1 М натрий-ацетатный буфер, содержащий 0,05 М NaCl, pH 3,7; спиртовой раствор ФМСФ, раствор дансил-фен-лей-арг (DNS-FLR); 1 н HCl, хлороформ; диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭЦ); набор растворов для определения белка по Лоури, печень животного.

Колонку для хроматографии закрепляют в вертикальном положении, закрывают нижний конец пробкой со вставленным фитингом, помещают в основание колонки кружок фильтровальной бумаги, размер которого должен точно соответствовать внутреннему размеру колонки. Заливают примерно 2 мл раствора 0,05 М натрий-ацетатного буфера, содержащего 0,05 М NaCl, pH 6,0, дают заполниться фитингу и через воронку по стенке заливают густую суспензию ДЭАЭЦ. Открывают зажим колонки и дают раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы колонка не обсохла. Суспензию ДЭАЭЦ прибавляют до тех пор, пока ее высота в колонке не достигнет нужного уровня, верхняя поверхность геля (стартовая зона) должна быть строго горизонтальной. Затем на поверхность геля помещают кружок фильтровальной бумаги. Колонку промывают (уравновешивают) 20 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера, содержащего 0,05 М NaCl, pH 6,0.

4 г печени животного гомогенизируют на льду в 10 мл буфера. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для удаления пленок. В пробирку отбирают 100 мкл центрифугированного гомогената и добавляют 4,9 мл буфера. Перешивают и помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка в гомогенате.

Открывают зажим колонки и сливают столбик буфера, находящийся над гелем. Когда нижний мениск раствора коснется поверхности кружка фильтровальной бумаги, на колонку осторожно с помощью шприца наносят 1 мл центрифугированного гомогената. Дают образцу впитаться и затем быстро смывают остатки образца со стенок колонки тем же объёмом растворителя. Затем заполняют колонку раствором 0,05 М натрий-ацетатного буфера, содержащего 0,05 М NaCl, pH 6,0, закрывают верхней пробкой с иглой и подсоединяют фитингом к сосуду, из которого поступает элюирующий раствор. Для удаления несвязавшихся белков колонку промывают 50 мл буфера.

Затем фермент элюируют 1 М натрий-ацетатным буфером с 0,05 М NaCl, pH 3,7. С момента этого буфера на колонку собирают 12 фракций объемом 2 мл.

Во 2, 4, 5, 6, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 фракциях и в разведенном гомогенате измеряют активность ФМСФ-КП по следующей схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| Опыт ( – ) | Контроль ( + ) |
| 150 мкл буфера | 140 мкл буфера |
| 50 мкл гомогената | 50 мкл гомогената |
| – | 10 мкл раствора ФМСФ (добавляют специально откалиброванной стеклянной пипеткой) |
| Преинкубация 8 минут при 37°С |
| 50 мкл раствора DNS-FLR | 50 мкл раствора DNS-FLR |
| Инкубация 30 мин при 37°С |
| 50 мкл 1 н HCl | 50 мкл 1 н HCl |

После окончания реакции в каждую пробирку добавляют 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивают штатив в течение 60 сек. Затем пробирки помещают в центрифуги и центрифугируют их 10 мин при 1000 об/мин для разделения фаз. Отбирают хлороформную фракцию и измеряют величину флюоресценции на флюориметре (λех=360 нм, λем=530 нм). Количество белка в пробе определяют по Лоури. Активность ФМСФ-КН рассчитывают как разность флюоресценции проб, не содержащих ФМСФ и проб, содержащих ФМСФ, и выражают в нМ продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Формула для расчета активности:

а =

Содержание отчета

1. Определите степень очистки ФМСФ-КП.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракция | Гомогенат | 2 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 |
| Активность |  |  |  |  |  |  |  |
| Степеньочистки | 100% |  |  |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракция | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 | 24 |
| Активность |  |  |  |  |  |  |  |
| Степеньочистки |  |  |  |  |  |  |  |

**Работа 11. Изучение субклеточного распределения ДНКазы (фермента-маркера ядерной фракции) в животных тканях**

Оборудование и реактивы: центрифуга с охлаждением; ФЭК; гомогенизатор; печень животного; пипетки; ДНК; 0,1 М NaOH; 0,01% раствор крезолового красного; 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 М трис-буфер рН 7,4 (среда А); 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 μМ MgCl2∙6H2O рН 5,0 (среда Б); набор растворов для определения белка по Лоури.

Навеску ткани 2 г переносят в стакан гомогенизатора и добавляют 20 мл среды Б, гомогенизируют. Отбирают 2 мл на определение активности фермента и содержания белка в гомогенате. Центрифугирование и отбор фракций для анализа производят по следующей схеме.

супернатант центрифугируют

12000g 20 мин

Гомогенат

центрифугируют

10 мин при 4000g

Осадок (митохон. фр.)

ресуспендируют в среде А и доводят объем до 18мл

Супернатант

центрифугируют

20 мин при 20000g

Осадок (ядерная фр.)

ресуспендируют в среде А и доводят объем до 18 мл

Супернатант, доводят объем до 18 мл

средой Б

центрифугируют

60 мин при 20000g

Осадок (лизосом. фр.)

ресуспендируют в среде А и доводят объем до 18мл

Конечный

супернатант

Осадок (микросомальная фр.)

ресуспендируют в среде А и доводят объем до 18мл

Ресуспендирование проводят гомогенизированием полученных осадков в 4-6 мл среды гомогенизации (б), затем полученную суспензию переносят количественно в мерный цилиндр на 20 мл и объем суспензии доводят до 18 мл; таким образом, концентрация субклеточных структур достигает исходной (как в гомогенате) концентрации.

Активность ДНКазы определяют в исходном гомогенате, ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и растворимой клеточной фракции по следующей схеме.

|  |
| --- |
| 1 мл раствора ДНК (1 мг/мл) |
| 1 мл 0,01% раствора крезолового красного |
| 1 мл буфера А |
| Преинкубация 8 минут при 37 °С |
| 1 мл нагретого раствора фракции |

Смесь быстро переливают в фотометрическую кювету (L=1 см) и измеряют оптическую плотность на ФЭК при 590 нм против буфера А. После измерения смесь немедленно переливают в исходную пробирку и инкубируют 20 мин при 37°С. Измеряют оптическую плотность системы после инкубации. Количество белка определяют по Лоури.

Содержание отчета

1. Расчет полученных данных представляют в виде таблицы.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракции | Г | Я | ТМ | ЛМ | Р | С |
| Анализируемые пробы  | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. |
| Оптическая плотность,в каждой параллели и среднее |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Аоп – Акн |  |  |  |  |  |  |
| Активность на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Активность фракции в % от гомогената | 100 % |  |  |  |  |  |
| Количество белка на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Белок в % от белка гомогената | 100 % |  |  |  |  |  |
| Относительная удельная активность фракций |  |  |  |  |  |  |

**Работа 12. Изучение субклеточного распределения кислых протеаз (ферментов-маркеров лизосом) в животных тканях**

Оборудование и реактивы: центрифуга; печень животного; пипетки; 0,01 М фосфатный буфер, содержащий 0,32 М сахарозы, рН 7,55; 100 мМ натрий-ацетатный буфер рН 3,3; 8% раствор гемоглобина; 5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); тирозин кристаллический; 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 М трис-буфер рН 7,4 (среда А); 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 μМ MgCl2∙6H2O рН 5,0 (среда Б).

Навеску ткани 2 г переносят в стакан гомогенизатора и добавляют 20 мл среды Б, гомогенизируют. Отбирают 2 мл на определение активности фермента и содержания белка в гомогенате. Центрифугирование и отбор фракций для анализа производят по схеме, приведенной в работе № 11.

Активность кислых протеаз определяют в исходном гомогенате, ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и растворимой клеточной фракции по следующей схеме.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 200 мкл фракции | 200 мкл фракции |
| 600 мкл NaAc буфера, рН 3,3 | 800 мкл NaAc буфера, рН 3,3 |
| Преинкубация 8 минут при 37°С |
| 200 мкл 8% раствора гемоглобина | –  |
| Инкубация 40 минут при 37°С |
| 1 мл 5 % ТХУ | 1 мл 5 % ТХУ |

Пробы центрифугируют 30 мин при 4000 об/мин. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и определяют количество образовавшегося тирозина спектрофотометрически при 280 нм. Количество белка в супернатанте определяют спектрофотометрически при 280 нм. Активность фермента определяют по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика

Готовят рабочий раствор тирозина с концентрацией 100 мкг/мл. Затем производят его разведение в соответствии со схемой.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № пробирки | V р-ра тир | V р-ра воды | Конц, мкг/мл | Dср |
| 1 | 0,5 | 4,5 |  |  |
| 2 | 1 | 4 |  |  |
| 3 | 1,5 | 3,5 |  |  |
| 4 | 2,0 | 3 |  |  |
| 5 | 2,5 | 2,5 |  |  |
| 6 | 3,0 | 2,0 |  |  |
| 7 | 3,5 | 1,5 |  |  |
| 8 | 4,0 | 1,0 |  |  |
| 9 | 4,5 | 0,5 |  |  |
| 10 | 5,0 | 0,0 |  |  |

Содержание отчета

1. Расчет полученных данных представляют в виде таблицы.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракции | Г | Я | ТМ | ЛМ | Р | С |
| Анализируемые пробы  | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. |
| Оптическая плотность,в каждой параллели и среднее |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Аоп – Акн |  |  |  |  |  |  |
| Количество тирозина по калибровочной кривой |  |  |  |  |  |  |
| Активность на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Активность фракции в % от гомогената | 100% |  |  |  |  |  |
| Количество белка на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Белок в % от белка гомогената | 100% |  |  |  |  |  |
| Относительная удельная активность фракций |  |  |  |  |  |  |

**Работа 13. Изучение субклеточного распределения сукцинатдегидрогеназы (маркера митохондрий) в животных тканях**

Оборудование и реактивы: центрифуга; печень животного; пипетки; буфер фосфатный 0,067 М (субстратный), рН 7,55; 0,5 М раствор сукцината натрия в субстратном буфере; 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 М трис-буфер рН 7,4 (среда А); 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 μМ MgCl2∙6H2O рН 5,0 (среда Б); 0,02 М раствор феназинметасульфата\*; 0,001 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ)\*\*.

\* Приготовление раствора феназинметасульфата. 12 мг вещества переносят в стеклянную пробирку, добавляют 2 мл дистиллированной воды, закрывают пробкой и перемешивают. РЕАКТИВ ГОТОВЯТ В ДЕНЬ ОПЫТА.

\*\* Приготовление раствора ДХФИФ. 17 мг вещества растворяют в колбе на 50 мл. РЕАКТИВ ГОТОВЯТ В ДЕНЬ ОПЫТА.

Навеску ткани 2 г переносят в стакан гомогенизатора и добавляют 20 мл среды Б, гомогенизируют. Отбирают 2 мл на определение активности фермента и содержания белка в гомогенате. Центрифугирование и отбор фракций для анализа производят по схеме, приведенной в работе № 11.

 Активность сукцинатдегидрогеназы определяют в исходном гомогенате, ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и растворимой клеточной фракции по одной из следующих схем:

а) кинетическая схема определения активности.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 400 мкл субстратного буфера | 600 мкл субстратного буфера |
| 200 мкл сукцината натрияна субстратном буфере | – |
| 200 мкл 0,02 М феназинметасульфата | 200 мкл 0,02 М феназинметасульфата |
| 200 мкл 0,001 М ДХФИФНЕПОСРЕДСТВЕННОПЕРЕД ОПЫТОМ | 200 мкл 0,001 М ДХФИФНЕПОСРЕДСТВЕННОПЕРЕД ОПЫТОМ |
| Инкубация на водяной бане 3 мин при 37 °С  |
| 3 мл фракции,НАГРЕТОЙ ДО 37 °С | 3 мл фракции,НАГРЕТОЙ ДО 37 °С |

Смесь быстро перемешивают и немедленно переливают в кювету (l = 1 см), на секундомере отмечают время начала реакции. Измеряют оптическую плотность системы на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при 600 нм каждые 20 сек в течении 3 мин. Аналогичным образом измеряют снижение оптической плотности в контрольных пробах, не содержащих сукцината. Белок определяют по Лоури. При расчете истинной активности сукцинатдегидрогеназы величины эндогенной активности вычитают из величин, выражающих активность сукцинатдегидрогеназы в пробах, содержащих сукцинат.

Активность выражают в нмолях окисленного сукцината за 1 мин на 1 мг белка, учитывая, что снижение оптической плотности на 1,0 эквивалентно восстановлению 60 нмолей 2,6-ДХФИФ, а количество восстановленного красителя пропорционально количеству окисленного сукцината.

б) стационарная схема определения активности.

|  |  |
| --- | --- |
| опыт | контроль |
| 400 мкл субстратного буфера | 600 мкл субстратного буфера |
| 200 мкл сукцината натрияна субстратном буфере | – |
| 200 мкл 0,02 М феназинметасульфата | 200 мкл 0,02 М феназинметасульфата |
| 200 мкл 0,001 М ДХФИФНЕПОСРЕДСТВЕННОПЕРЕД ОПЫТОМ | 200 мкл 0,001 М ДХФИФНЕПОСРЕДСТВЕННОПЕРЕД ОПЫТОМ |
| Инкубация на водяной бане 3 мин при 37 °С  |
| 3 мл фракции,НАГРЕТОЙ ДО 37 °С | 3 мл фракции,НАГРЕТОЙ ДО 37 °С |
| Инкубация на водяной бане 30 мин при 37°С |
| 1 мл 1 н HCl | 1 мл 1 н HCl |

Затем пробы переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин про 4000 об/мин. Измеряют оптическую плотность системы на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при 600 нм. Белок определяют по Лоури. При расчете истинной активности сукцинатдегидрогеназы величины эндогенной активности вычитают из величин, выражающих активность сукцинатдегидрогеназы в пробах, содержащих сукцинат.

Активность выражают в нмолях окисленного сукцината за 1 мин на 1 мг белка, учитывая, что снижение оптической плотности на 1,0 эквивалентно восстановлению 60 нмолей 2,6-ДХФИФ, а количество восстановленного красителя пропорционально количеству окисленного сукцината.

Содержание отчета

1. Расчет полученных данных представляют в виде таблицы.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракции | Г | Я | ТМ | ЛМ | Р | С |
| Анализируемые пробы  | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. |
| Оптическая плотность,в каждой параллели и среднее |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Аоп – Акн |  |  |  |  |  |  |
| Количество сукцината |  |  |  |  |  |  |
| Активность на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Активность фракции в % от гомогената | 100% |  |  |  |  |  |
| Количество белка на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Белок в % от белка гомогената | 100% |  |  |  |  |  |
| Относительная удельная активность фракций |  |  |  |  |  |  |

**Работа 14. Изучение субклеточного распределения глюкозо-6-фосфатазы (маркера микросомальной фракции) в животных тканях**

Оборудование и реактивы: центрифуга; печень животного; пипетки; 0,1 М цитратный буфер рН 6,5; 0,08 М раствор глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) в 0,1 М цитратном буфере\*\*\*\*; 10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); раствор молибдата аммония\*; восстанавливающий раствор\*\*; стандартный раствор фосфора (5∙10-5 М)\*\*\*.

\* Приготовление раствора молибдата аммония. 2,5 г молибдата аммония растворяют в 50 мл воды; 14 мл конц. серной кислоты приливают к 200 мл воды. Разбавленную кислоту наливают в раствор молибдата и доводят объем до 1000 мл.

\*\* Приготовление восстанавливающего раствора. К 1,8 г Na2SO3 приливают 11,3 мл 1 н HCl и 5 мл воды. Затем растворяют 25 мг 1-амино-2-нафтол-4-сульфокислоты и доводят общий объем до 25 мл. ГОТОВЯТ В ДЕНЬ ОПЫТА.

\*\*\* Приготовление стандартного раствора фосфора. 68 мг КН2РО4 растворяют в 20 мл воды и добавляют 10 мл конц. серной кислоты и доводят объем до 1000 мл.

\*\*\*\* Приготовление раствора Г-6-Ф. 55 мг глюкозо-6-фосфата растворяют в 2 мл 0,1 М цитратного буфера рН 6,5. ГОТОВЯТ В ДЕНЬ ОПЫТА.

Навеску ткани 2 г переносят в стакан гомогенизатора и добавляют 20 мл среды Б, гомогенизируют. Отбирают 2 мл на определение активности фермента и содержания белка в гомогенате. Центрифугирование и отбор фракций для анализа производят по схеме, приведенной в работе № 11.

 Активность глюкозо-6-фосфатазы определяют в исходном гомогенате, ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и растворимой клеточной фракции по следующей схеме.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| опыт | контроль 1 | контроль 2 |
| 100 мкл фракции | 100 мкл фракции | 100 мкл буфера |
| Инкубация 10 мин при 37°С |  –  | – |
| 100 мкл Г-6-Ф | 100 мкл буфера | 100 мкл Г-6-Ф |
| Инкубация 20 мин при 37°С |
| 2 мл 10 % ТХУ  |

Центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин. Далее в стеклянных пробирках производят смешение согласно схеме.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| опыт | контроль 1 | контроль 2 | стандарт |
| 1 мл надосадочной жидкости | 1 мл станд. р-ра фосфора |
| 5 мл раствора молибдата |

Затем в каждую пробирку через промежутки времени, необходимые для дальнейшего колориметрического измерения, приливают по 1 мл восстанавливающего раствора.

Каждую пробу оставляют на 15 мин при комнатной температуре и затем промеряют экстинкцию при 750 нм на ФЭК. Количество белка определяют по Лоури. Активность фермента выражают в ммолях фосфата, отщепленного за 1 мин инкубации на 1 мг белка.

Содержание отчета

1. Обоснуйте наличие в данной методике двух контролей и стандарта.

2. Расчет полученных данных представляют в виде таблицы:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракции | Г | Я | ТМ | ЛМ | Р | С |
| Анализируемые пробы  | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. | Оп. Кн. |
| Оптическая плотность,в каждой параллели и среднее |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Аоп – Акн |  |  |  |  |  |  |
| Количество фосфата |  |  |  |  |  |  |
| Активность на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Активность фракции в % от гомогената | 100% |  |  |  |  |  |
| Количество белка на 1 мг ткани |  |  |  |  |  |  |
| Белок в % от белка гомогената | 100% |  |  |  |  |  |
| Относительная удельная активность фракций |  |  |  |  |  |  |

**Работа 15. Определение глюкозы в крови человека с использованием ферментных электродов**

Оборудование и реактивы: свежая кровь (взятая непосредственно перед определением)\*, стеклянные капилляры Roche, автоматический анализатор Roche Omni S 6\*\*.

\*Для работы используется капиллярную кровь из пальца. Палец обработать ватой, смоченной медицинским спиртом, произвести прокол скарификатором с помощью автоматической ручки-прокалывателя. Кровь собирать в стеклянный капилляр Roche.

\*\* Перед работой с прибором внимательно ознакомьтесь с его строением и правилами эксплуатации.

В ферментных электродах фермент и электрод образуют единую конструкцию, не требующую для функционирования дополнительных реагентов, кроме буферных растворов. Такие электроды получили название «безреагентных» датчиков, а основанные на их использовании методы анализа называются «безреагентными». Для определения глюкозы используется фермент глюкозооксидаза, иммобилизованная ковалентным связыванием с полупроницаемой поликарбонатной мембраной. Измерение осуществляется с помощью амперометрии. Операционные характеристики электрода остаются стабильными на протяжении двух-четырех недель.

Проведите измерение трех разных образцов крови. Переведите прибор в режим работы с капиллярной кровью. Снимите верхнюю крышку с анализатора для ознакомления с ходом распределения образца крови во время анализа. Поместите капилляр с образцом в диск-приемник (Fill Port). Активируйте всасывание образца. Анализатор автоматически перейдет в режим измерения. Изучите распределение образца крови и прохождение буферных и промывающих растворов. Дождитесь окончания измерения и распечатайте отчет.

Содержание отчета

1. Запишите результаты определений глюкозы в крови.

2. Зарисуйте схемы устройства ферментного электрода и автоматического анализатора.

**Работа 16. Определение мочевины в крови человека с использованием ферментных реагентов**

Оборудование и реактивы: свежая кровь (взятая непосредственно перед определением)\*, стеклянные капилляры Roche, автоматическая пипетка с наконечниками, биохимический анализатор Рефлотрон +.

\*Забор крови осуществляется в капилляр, как описано в работе № 14.

\*\* Перед работой с прибором внимательно ознакомьтесь с его строением и правилами эксплуатации.

Биохимический анализатор Рефлотрон предназначен для экспресс-анализа образцов свежей крови и сыворотки человека. Прибор не требует для работы никаких реактивов, кроме тест-полосок для однократного определения исследуемых веществ. Тест-полоска для определения мочевины содержит лиофилизированный фермент уреазу и индикатор в лейко-форме. Образец нагревают, и мочевина, содержащаяся в образце, при 37۫°С расщепляется с образованием аммиака и оксида углерода. Это ведет к частичной смене окраски индикатором на зелено-голубую, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству мочевины в пробе:

(NH2)2CO + H2O = 2 NH3 + CO2

NH3 + индикатор (бесцветный) = NH4+ + индикатор (сине-зеленый).

После 3 минут, необходимых для инкубации образца, измеряется оптическая плотность по принципу рефлексионной фотометрии. На тест-полоске имеется магнитная лента с информацией об анализе. Прибор считывает информацию об анализе и пересчитывает оптическую плотность в концентрацию.

Приготовьте тест-полоску для анализа. Удалите с ее поверхности защитную алюминиевую полоску. Дозатором отмерьте 32 мкл образца и нанесите его в центр зоны аппликации, не касаясь наконечником тест-полоски. Откройте крышку прибора и поместите тест-полоску в анализируемую зону. Закройте крышку. Анализатор автоматически перейдет в режим измерения. Дождитесь окончания измерения и распечатайте отчет.

Содержание отчета

1. Запишите результаты определений мочевины в крови.

**Работа 17. Иммуноферментное определение тестостерона в сыворотке крови**

Оборудование и реактивы: сыворотка крови человека, автоматическая пипетка с наконечниками, набор стандартных растворов тестостерона с известными концентрациями, иммуноферментный коньюгат, субстратный раствор, стоп-раствор, стрипы с иммобилизованными моноклональными антителами к тестостерону, инкубатор для планшет, вошер для планшет, иммуноферментный ридер планшет.

Тест-система ИФА для определения тестостерона основана на принципе конкурентного связывания. Лунки микротитра покрыты антителом к уникальному антигенному сайту на молекуле тестостерона. Эндогенный тестостерон в пробе конкурирует с конъюгатом тестостерона и пероксидазы хрена за связывание с антителом, которое сорбировано на микропанелях. После инкубации несвязавшийся конъюгат смывается. Количество связавшегося конъюгата обратно пропорционально концентрации тестостерона в образце. При добавлении субстратного раствора интенсивность полученного окрашивания обратно пропорциональна концентрации тестостерона в сыворотке.

Общие замечания к проведению анализа

− Все пробы и реагенты перед проведением анализа должны быть доведены до комнатной температуры. Смешивание реагентов надо осуществлять, избегая вспенивания.

− После начала проведения теста следует осуществлять все этапы последовательно без прерывания.

− Для каждого реагента используйте новые чистые пластиковые наконечники микропипеток для исключения перекрестной контаминации. Для раскапывания субстрата и останавливающего раствора не следует использовать пипетки с металлическими частями.

− Вносите стандарты и пробы в нижнюю часть лунки с помощью микропипетки. Что касается внесения Иммуноферментного Конъюгата и Стоп-раствора, рекомендуется держать пипетку вертикально и направлять падающую каплю строго в центр лунки для осуществления полного перемешивания указанных компонентов.

− Перед постановкой теста рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, закрепить в держателе необходимое количество полосок с лунками. Это обеспечит равные затраты времени на все необходимые этапы ИФА и предотвратит задержки пипетирования.

− В целом ферментативная реакция обычно линейно пропорциональна времени проведения и температуре. Это делает возможной интерполяцию для физико-химических условий реакции. В частности, если величина абсорбции нулевого стандарта ниже 1,0 или же превышает верхний уровень возможного измерения для используемого ридера, можно изменить время инкубации с субстратом до 30 мин, или же до 10 мин, соответственно этим наблюдениям.

− Поскольку калибрующие стандарты проставляются в каждом тесте, флюктуации абсолютных величин абсорбции не отражаются на конечном результате ИФА.

− Раствор субстрата перед использованием должен быть бесцветным или иметь чуть различимый голубовато-зеленоватый оттенок. Наличие выраженного голубого окрашивания указывает на непригодность субстрата. Его следует заменить!

− Во время инкубации с Субстратом следует защитить микротитровальные панели от света.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА

1. Для исследования надо использовать сыворотки, или же плазму после обработки EDTA. Не требуется какой-либо дополнительной подготовки проб. Пробы для анализа можно хранить при 2 – 8 °С до 5 дней, при необходимости более длительного хранения пробы необходимо замораживать и хранить при – 20 °С или более низкой температуре. Не используйте пробы с выраженным гемолизом или с повышенным содержанием липидов.

2. Пробы, содержание тестостерона в которых предположительно превышает 16 нг/мл, следует разводить с использованием нулевого стандарта.

3. Если при первой постановке образец сыворотки показал концентрацию больше, чем высший стандарт, то образец должен быть разведен в 10 или в 100 раз нулевым стандартом и проанализирован снова. При подсчете должен приниматься во внимание фактор пересчета.

ВНИМАНИЕ! В данном тесте нельзя использовать пробы, содержащие азид натрия.

1. Закрепите желаемое количество полосок с подготовленными лунками в держателе.

2. Внесите по 25 мкл стандартов тестостерона и проб в соответствующие лунки.

3. Внесите 200 мкл иммуноферментного конъюгата в каждую лунку.

4. В течение 10 сек. смешивайте реагенты в панели. На этом этапе чрезвычайно важно добиться полного смешивания реагентов.

5. Не закрывая панель, инкубируйте при комнатной температуре 60 мин.

6. Освободите лунки от содержимого (например выплеснув и постучав по фильтровальной бумаге). Трижды промойте лунки раствором для промывки (по 400 мкл в лунку). Тщательно “выбейте” остатки жидкости на фильтровальной бумаге. Операцию № 6 рекомендуется осуществлять в автоматическом режиме, используя автоматический вошер для планшет.

7. Внесите 200 мкл энзим-субстрата в каждую лунку с равными временными интервалами.

8. Инкубация 15 мин при комнатной температуре.

9. Остановите реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл стоп-раствора с такими же временными интервалами, как на этапе 7.

10. Измерьте оптическую плотность в лунках при длине волны 450 + 10 нм в течение 10 мин после добавления стоп-раствора

Содержание отчета

1. Определите значение абсорбции для стандартов и образцов.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Конц. стандартов, нг/мл |  |  |  |  |  |
| Величина абс., D |  |  |  |  |  |

2. Используя любую миллиметровую или логарифмическую сетчатую бумагу, постройте стандартную кривую, нанося значения абсорбции (Y) Стандартов против их концентрации (Х) в нг/мл.

3. Используйте среднюю величину абсорбции каждой пробы для интерполяции концентрации Тестостерона путем простого наложения данных на указанную кривую.

Запишите концентрацию тестостерона в сыворотке крови.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Работы № 11 – № 14 выполняются каждая в течении одного дня, так как ферменты-маркеры субклеточных фракций инактивируются при замораживании-оттаивании. В случае нехватки времени на выполнение полной схемы работы выполняются в следующем варианте:

- активность ферментов-маркеров определяется в свежеприготовленном 1% гомогенате. 100 мг печени гомогенизируется в 1,9 мл рабочего буфера (в работе № 11 - 0,01 М трис-буфер рН 7,4; в работе № 12 - 100 мМ натрий-ацетатный буфер рН 3,3; в работе № 13 - буфер фосфатный 0,067 М (субстратный), рН 7,55; в работе № 14 - 0,1 М цитратный буфер рН 6,5). Затем гомогенат центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для удаления пленок.

2. Определение белка по Лоури. Необходимые реактивы: реактив Фолина, реактив А, реактив В.

Реактив А. 0,5 г CuSO4·5H2O + 1 г цитрата Na на 100 мл воды, хранить в морозильнике. Для использования разморозить небольшую часть и хранить в холодильнике.

Реактив В. 4 г NaOH + 54 г Na2CO3·10H2O (или 20 г Na2CO3) на литр воды.

Реактив С. 50 мл В + 1 мл А. Готовить непосредственно перед определением концентрации белка.

Для определения концентрации в три пробирки наливают по 0,5 мл разведенного раствора белка, в каждую из трех пробирок и в контроль (0,5 мл дист. воды) приливают по 1 мл реактива С, перемешивают и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Затем приливают по 0,1 мл реактива Фолина и выдерживают 40 мин при комнатной температуре. Можно больше. Все пипетки сразу промыть дистиллированной водой. Измеряют светопоглощение на ФЭК при λ=750 нм в кювете толщиной 1 см против контроля.

**Библиографический список**

1. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. - М.: Наука, 1986. – 332 с.

2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. - М.: Мир, 1982. - Т. 1 – 3.

3. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. - М.: Мир,

1980. – 432 с.

4. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. – М.: Мир, 1986. – 374 с.

5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высш. школа, 1980. – 272 с.

6. Практикум по биохимии/ под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьёвой.

– М.: МГУ, 1989. – 509 с.

7. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. – М.: Наука, 1978. – 248 с.

8. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир,

1979. – 280 с.

9. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. – М.: Мир, 1983. – 293 с.

10. Бернхард С. Структура и функция ферментов. – М.: Мир, 1971. – 334 с.

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ

УНИВЕРСИТЕТ ИМ. В. Г. БЕЛИНСКОГО

В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин

**Практикум по энзимологии**

**Учебно-методическое пособие**

Редактор – Л. И. Дорошина

Корректор – Е. С. Моисеева

Оригинал-макет – В. Б. Соловьев

Поз. 157

Подписано к печати 07.12.07 Формат 60 × 84 / 16

Бумага писчая белая Печать офсетная

Усл. – печ. л. 3,0 Уч. – изд. л. 3,2

Тираж экз. 100 Заказ № 175 / 07 Цена С. 183

Редакционно-издательский отдел ПГПУ им. В. Г. Белинского:

440026, Пенза, ул. Лермонтова, 37,

Педагогический университет, корпус 5, комната 466

Отпечатано с готового оригинал-макета в мини-типографии

ООО КФ «Партнер-ДелКон»:

г. Пенза, ул. Богданова, 2а,

тел. 52-58-60, 52-58-61

E-mail: p-audit@p-audit.ru, www.p-audit.ru