



**СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И
БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ**

**СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК**

Т.П. ПОБЕЖИМОВА, А.В. КОЛЕСНИЧЕНКО, О.И. ГРАБЕЛЬНЫХ

Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез

МОСКВА – 2004

УДК 581.1
ББК 28.57
П41

Печатается по решению Ученого совета
Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН

Ответственный редактор
Чл.-корр. РАН Р.К. Саляев

Рецензенты:
д.б.н., профессор, Ю.М. Константинов
д.б.н. профессор, В.П. Саловарова

Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, О.И. Грабельных

П41 Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез./ (Отв. ред. Р.К. Саляев) – Москва: ООО "НПК "ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ", 2004. - 98 с.
ISBN 5-98804-003-9

Быстрое развитие теоретических работ в области физиологии и биохимии растений и разработка новых экспериментальных методов исследования органелл растительной клетки требуют постоянного совершенствования методической подготовки исследователей-биологов. Изучение биоэнергетики растений на современном уровне связано с применением сложных методов выделения и анализа митохондрий растений. В то же время выделение функционально активных митохондрий растений имеет ряд особенностей и связано с преодолением определенных методических трудностей. В связи с этим возникла необходимость сведения в одном издании рекомендаций, основанных на нашем опыте многолетней работы по изучению растительных митохондрий.

Книга предназначена для студентов – биологов, аспирантов, преподавателей, ведущих подготовку специалистов по физиологии и биохимии растений и молекулярной биологии, а также научных сотрудников, проводящих экспериментальные работы в области физиологии и биохимии растений.

Данное издание подготовлено при поддержке Фонда содействия отечественной науке и молодежного гранта СО РАН (проект № 78).

ISBN 5-98804-003-9

ББК 28.57

СОДЕРЖАНИЕ:

1	ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ И АНАЛИЗ ИХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.....	6
1.1	ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ	11
1.2	МЕТОД ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ.....	28
2	ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ	37
2.1	ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО БЕЛКА.....	50
2.2	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ С ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ (ПААГ С ДДС-NA) (ДЕНАТУРИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ)	52
2.3	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПААГ НАТИВНОГО БЕЛКА В ГРАДИЕНТЕ ПОРИСТОСТИ ГЕЛЯ	58
2.4	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПААГ НАТИВНОГО БЕЛКА СО СДВИГОМ ЗАРЯДА	60
2.5	БЛОТТИНГ	62
2.6	ХОД ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.	69
3	ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	76
3.1	ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗЕ.....	77
3.2	ПЕРЕКРЕСТНЫЙ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ.....	79
3.3	РОКЕТ-ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ.	81
4	РАБОТА С ПРИБОРАМИ	85
5	СПРАВОЧНЫЕ ДАННЫЕ.....	93

ОТ РЕДАКТОРА

Обучение методам клеточной и молекулярной биологии получает все более широкое распространение в подготовке студентов-биологов. Большинство этих методов изложено или в научных статьях, или в протоколах различных фирм, поставляющих наборы для аналитических работ. Поэтому написание учебно-методического пособия с изложением современных методов, применяемых при исследованиях сложных биологических процессов, является особенно актуальным.

Настоящее пособие посвящено одному из центральных блоков метаболизма - дыхательным процессам митохондрий, тесно связанным с энергетикой дыхания. В нем подробно изложены и различные современные методы исследования белков. Специальный раздел пособия знакомит с приборами и приемами работы на них.

Пособие написано сотрудниками Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН - квалифицированными специалистами, принимающими активное участие, как в научной работе, так и в преподавательской деятельности в Иркутском Государственном Университете.

Пособие будет полезно, в первую очередь, студентам, которые проходят курс магистратуры, а также аспирантам и преподавателям.

*Заведующий кафедрой физиологии растений и клеточной биологии,
член-корреспондент РАН, профессор Р.К. Салеев*

ВВЕДЕНИЕ

Быстрое развитие теоретических работ в области физиологии и биохимии растений и разработка новых экспериментальных методов исследования органелл растительной клетки требуют постоянного совершенствования методической подготовки студентов-биологов. Изучение биоэнергетики растений на современном уровне связано с применением сложных методов выделения и анализа митохондрий растений. В то же время выделение функционально активных митохондрий растений имеет ряд особенностей и связано с преодолением определенных

методических трудностей. В связи с этим возникла необходимость сведения в одном методическом руководстве рекомендаций, основанных на нашем опыте многолетней работы по изучению растительных митохондрий.

Электрофоретические и иммунохимические методы анализа белков являются одними из наиболее широко применяемых в практике современных исследований нативных белков и полипептидов органелл растений. Наиболее широко при этом применяются электрофоретический анализ денатурированных белков в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг для выявления индивидуальных белков в полипептидном спектре. В связи с этим в данное издание включено описание ряда применяемых в настоящее время методов электрофоретического разделения белков и вестерн-блоттинга.

1 ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ И АНАЛИЗ ИХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Митохондрии – обязательные компоненты всех эукариотических клеток. Они окружены двойной мембраной, наружной и внутренней, и заполнены матриксом, содержащим растворимые ферменты, промежуточные продукты обмена, ДНК и рибосомы. Пространство между наружной и внутренней мембраной называется межмембранным пространством. Наружная мембрана гладкая, не имеет складок и перегибов, основная функция этой мембраны – отделение внутренней части митохондрий от цитоплазмы. Внутренняя мембрана образует большое число складок – крист. Эта мембрана сложно устроена и обладает множеством связанных между собой компонентов и функций (Рис. 1). Именно эта мембрана является сопрягающей и поэтому имеет ряд отличительных черт. Она содержит белковые комплексы двух типов. Один из них – АТФ-аза (или АТФ-синтетаза), которая катализирует энергозависимый синтез АТФ. Этот комплекс присутствует во всех сопрягающих мембранах. Другой белковый комплекс это дыхательная цепь, по которой идет перенос электронов от субстратов к кислороду. В результате переноса электронов по дыхательной цепи происходит перенос протонов через мембрану, что приводит к образованию электрохимического градиента протонов. Энергия этого градиента используется при синтезе АТФ.

Дыхательная цепь состоит из более чем 20 различных переносчиков электронов и множества структурных белков. С помощью детергентов дыхательную цепь можно разделить на четыре белковых комплекса (I, II, III, IV) (Рис. 2).

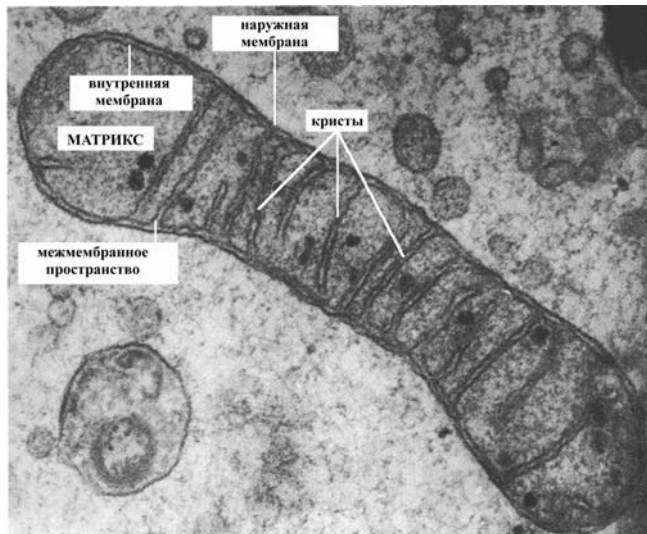


Рис. 1 Структура митохондрии.

Комплекс I (НАДН-дегидрогеназа) обеспечивает перенос электронов от НАДН на убихинон (Q). Комплекс II называется сукцинатдегидрогеназой и транспортирует электроны от сукцината к убихинону. Комплекс III (цитохром *c* редуктаза) осуществляет перенос электронов от убихинона к цитохрому *c*. Комплекс IV (цитохром *c* оксидоредуктаза) является терминальным комплексом в цепи переноса электронов. Электроны, пройдя цепь переносчиков, теряют значительное количество свободной энергии, этого количества энергии достаточно для синтеза трех молекул АТФ. В дыхательной цепи есть три участка, где выделяемая свободная энергия используется для синтеза АТФ. Эти участки являются пунктами энергетического сопряжения между переносом электронов и синтезом АТФ. Первый участок от НАДН до убихинона, второй – от убихинона до цитохрома *c*₁, третий – от цитохрома *c* до кислорода (Рис. 2).

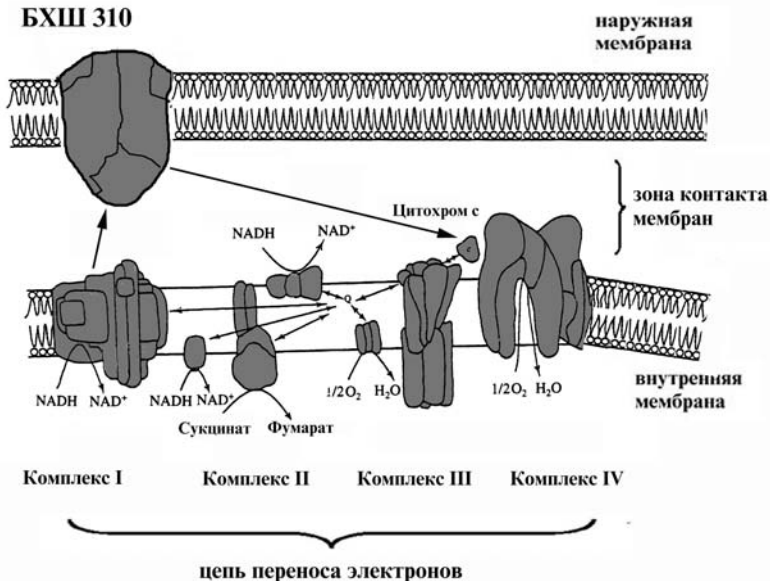


Рис. 2 Строение дыхательной цепи митохондрий озимой пшеницы

Митохондрии растений и животных имеют сходную организацию дыхательной цепи, хотя между ними имеются определенные различия. Растительные митохондрии имеют альтернативный цианид-резистентный путь переноса электронов и способны окислять экзогенный НАДН.

Ингибиторы отдельных компонентов электронтранспортной цепи

Важным инструментом при изучении последовательности и механизмов реакций фосфорилирования в дыхательной цепи являются специфические ингибиторы. Согласно Рэкеру (Рэкер, 1979), существует три класса соединений, препятствующих окислительному фосфорилированию.

1. Ингибиторы окислительной цепи – блокируют перенос электронов на определенном участке дыхательной цепи (цианид, антимицин, азид и др.).

2. Разобщители (разобщающие агенты) – подавляют фосфорилирование АДФ, не влияя при этом на перенос электронов, и стимулируют рассеивание энергии в виде тепла (2,4-динитрофенол, карбонил трифторфенилгидразон).

3. Ингибиторы переноса энергии - препятствуют превращению энергии окисления в АТФ, ингибируя перенос энергии (олигомицин, рутамицин).

В митохондриях животных поток электронов может ингибироваться в разных точках электронтранспортной цепи. Активность комплекса I ингибируется ротеноном, пиерицидином, амиталом (Николс, 1985). Ротенон образует прочный комплекс с НАДН-дегидрогеназой, и предполагают, что он блокирует перенос электронов от Fe-S-белков на убихинон. Для 65% ингибирования достаточно 33 нМ ротенона на 1г митохондриального белка. Амитал является барбитуратом и в высоких концентрациях блокирует НАДН-дегидрогеназу. Пиерицидин А – антибиотик, синтезируемый бактерией рода *Streptomyces*. Это структурный аналог убихинона и, следовательно, конкурирует с ним за перенос электронов. Ингибирование на 50% достигается при концентрации 20 нМ на 1г митохондриального белка (Гудвин, Мерсер, 1986).

Перенос электронов в комплексе II ингибируется теноилтрифторацетоном, который является избирательным ингибитором сукцинатдегидрогеназы, а также малонатом и оксалоацетатом.

Комплекс III ингибируется антимицином, который является антибиотиком. Он блокирует перенос электронов между цитохромом *b* и убихиноном в протонпроводящем Q-цикле. Блокирование происходит при низких концентрациях - при связывании 1 моля ингибитора с 1 молем фермента (Николс, 1985).

Комплекс IV блокируется цианидом, азидом и оксидом углерода (CO), причем во всех трех случаях ингибиторы взаимодействуют с цитохромом a_3 . Азид и цианид образуют координационный комплекс с Fe^{3+} феррицитохрома a_3 , а CO с Fe^{2+} . Блокирование на 50% достигается при действии азидата, цианида и CO в концентрациях 0,7; 0,5; 40 мМ, соответственно (Рис. 3) (Гудвин, Мерсер, 1986).

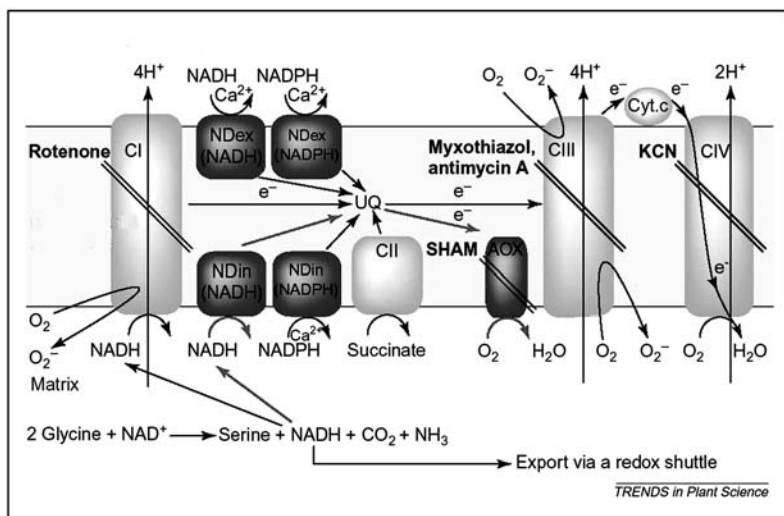


Рис. 3 Влияние ингибиторов на отдельные участки дыхательной цепи митохондрий растений (по Moller, 2002)

Обозначения: CI, CII, CIII, CIV – комплексы дыхательной цепи; NDex – наружные и NDin – внутренние ротенон- нечувствительные НАДН дегидрогеназы; AOX – альтернативная оксидаза; UQ – убихинон; Cyt.c – цитохром c.

Ингибитором АТФ-синтазы является олигомицин. Он тормозит ДНФ-стимулируемую АТФазу, дыхание в состоянии 3 по Чансу-Вильямсу (Рис. 3) и не влияет на дыхание в присутствии разобщителей (Скулачев, 1989).

Разобщители способны пересекать мембрану, катализируя при этом электрогенный унипорт протонов, и понижают сопротивление мембраны для протонов. Возникающий при этом ток приводит к короткому замыканию и разобщению генератора $\Delta\mu\text{H}^+$ АТФ-синтазы (цит. по Николсу, 1985).

В растительных митохондриях (Рис. 3) действуют практически те же ингибиторы. НАДН-дегидрогеназа комплекса I чувствительна к амиталу, ротенону и пирицидину, в то время как «внешняя» НАДН-дегидрогеназа не ингибируется ими. Это связано с тем, что последняя не содержит Fe-S-белков, на которые действуют данные ингибиторы. Кроме того, как уже отмечалась, растительные митохондрии на внутренней стороне внутренней мембраны содержат ротеноннечувствительную НАДН-дегидрогеназу (Гудвин, Мерсер, 1986).

Альтернативная оксидаза ингибируется гидроксамовыми кислотами, пропилгаллатом и дисульфирамом (Рис. 3) (Day et al., 1994).

1.1 ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Получение функционально активных митохондрий из растений связано с рядом определенных трудностей. В первую очередь, к ним относится наличие плотных и жестких клеточных оболочек, вызывающих механические повреждения при растирании клеток. Отрицательную роль играют кислая реакция клеточного сока, выделяющегося в процессе гомогенизации ткани, а также содержащиеся в значительном количестве во многих растительных клетках фенольные соединения, являющиеся разобщающими агентами и ингибиторами. Другие особенности растительных тканей, например высокое содержание крахмала, хлорофилла, масел и т.д., также оказывают влияние на качество и чистоту изолированной митохондриальной фракции. Поэтому для получения интактных митохондрий в каждом конкретном случае в

зависимости от объекта и его физиологического состояния необходимо подбирать оптимальные условия выделения органелл.



Рис. 4. Криостат для выделения интактных митохондрий и белков

Процедура выделения митохондрий включает четыре этапа: 1) гомогенизация; 2) отделение митохондриальной фракции методом дифференциального центрифугирования; 3) очистка полученной фракции путем повторного промывания; 4) определение чистоты и качества полученного препарата митохондрий. Все операции по выделению митохондрий должны проводиться в строго контролируемых условиях, при температуре $0-4^{\circ}\text{C}$, для чего необходимо иметь криостат (Рис. 4) и рефрижераторные центрифуги. Во время всей процедуры выделения органелл как растворы, так и посуда должны находиться в воде со льдом. Прежде чем приступать к практической работе,

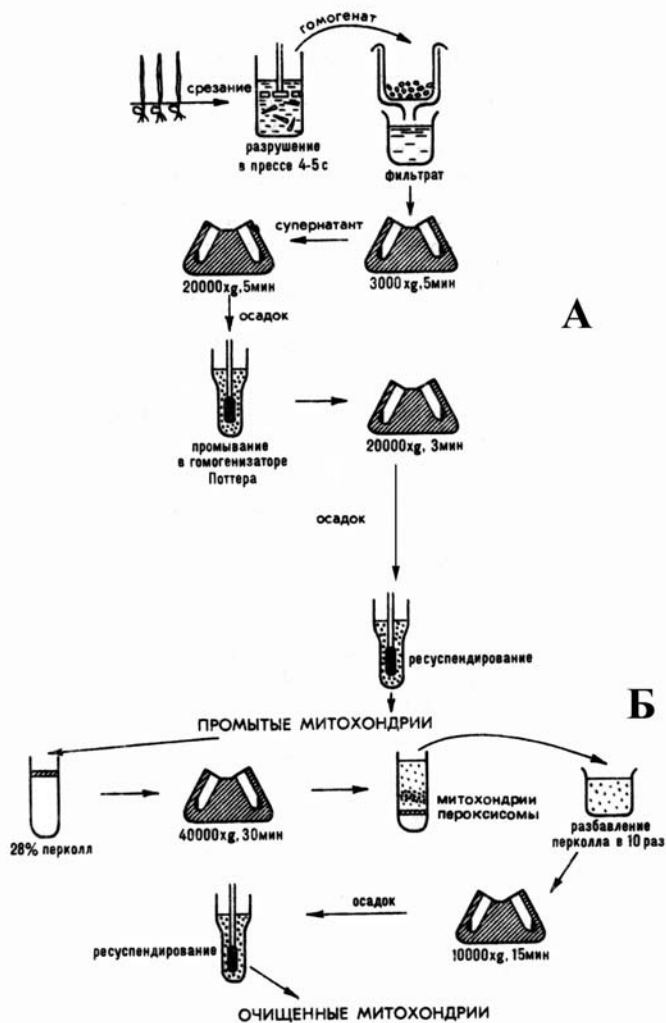


Рис. 5 Схема выделения (А) и очистки на градиенте перколл (Б) митохондрий проростков растений (по Войников, 1991)

необходимо внимательно ознакомиться с предлагаемыми инструкциями по методической части и по работе с приборами (инструкции по работе с приборами приведены в конце методического пособия).

Гомогенизация. Процесс гомогенизации должен быть достаточно быстрым. Для разрушения растительной ткани можно применить несколько способов: измельчение в ступке, гомогенизация в блендере при умеренных скоростях вращения, разрушение растительных тканей с помощью пресса, использование гомогенизатора Поттера. Применение пресса для разрушения тканей этиолированных побегов проростков растений значительно сокращает время проведения гомогенизации и позволяет получить интактные митохондрии (Андреева, 1968; Соттоказа, 1979; Войников, 1980; Douce, 1985).

Особые требования предъявляются к составу среды гомогенизации. Для предотвращения повреждения мембран митохондрий и создания изотонических условий среда гомогенизации должна включать **осмотик** (чаще всего сахарозу или же маннит и сорбит). Сахароза не только создает определенную тоничность среды, но и способствует лучшей сохранности митохондрий, стабилизируя митохондриальные мембраны. С целью нейтрализации гомогената, закисляемого органическими кислотами, выходящими из вакуоли, используется **буферная система**. Наиболее часто используется два типа буфера – фосфатный и трис (триоксиметиламинометан), имеющих слабощелочной pH. В подборе концентрации буфера и pH среды важно установить, насколько сильно происходит смещение pH при измельчении опытной ткани (наиболее благоприятна для митохондрий среда, близкая к нейтральной). Добавляемые в среду гомогенизации **восстанавливающие агенты** (цистеин, аскорбиновая кислота) снижают скорость окислительных процессов, например перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий, защищают сульфгидрильные группы от продуктов окисления фенольных

соединений. В среду промывания и при инкубации цистеин не вносится, присутствие его в реакционной среде повышает окисление эндогенных субстратов митохондрий. Удаление избытка двухвалентных катионов, ингибирующих окисление и фосфорилирование, достигается с помощью **хелатирующих агентов** (комплексообразователей) – ЭДТА и ЭГТА. Хелатирующее действие ЭДТА связывают с полианионными свойствами ее молекулы, содержащей четыре карбоксильных группы. В среду выделения митохондрий вносят **ионы металлов**, особенно часто Mg^{++} , который также стабилизирует структуру митохондрий. Разобщающее действие на мембраны митохондрий свободных жирных кислот устраняется с помощью **бычьего сывороточного альбумина** (БСА), обладающего адсорбирующими свойствами. В большинстве случаев используются концентрации от 0,1 до 0,5%. Все растворы для выделения митохондрий готовятся на бидистиллированной воде.

Отделение митохондриальной фракции методом дифференциального центрифугирования. Дифференциальное центрифугирование субклеточных структур основано на различии в их размерах и плотности (Рис. 5). Дифференциальное центрифугирование используется для разделения компонентов гомогената на ряд фракций (обычно пять): ядра, хлоропласты, митохондрии, микросомы и надосадочная фракция (смесь растворимой фазы цитоплазмы с растворимым содержимым вакуоли и любых других разрушившихся органелл). Каждая из фракций осаждается при определенной скорости центрифугирования и времени. Полученные фракции не являются чистыми. Во фракции ядер в качестве основных примесей содержатся также остатки разрушенных клеток, хлоропласты и фрагменты хлоропластов. Фракция хлоропластов обычно загрязнена ядрами и ядерными фрагментами. Митохондриальная фракция содержит в качестве примеси пропластиды и, если гомогенизация была мягкой, микротельца (пероксисомы и глиоксисомы в

зависимости от ткани). Микросомная фракция часто бывает загрязнена митохондриями. Все фракции частиц могут быть очищены путем осторожного суспендирования их в гомогенизационной среде и повторного центрифугирования при таком ускорении, при котором они были первоначально осаждены. Однако чаще всего для очистки используется центрифугирование в градиенте плотности.

Очистка полученной фракции путем повторного промывания. Как было отмечено выше, для получения более чистой фракции используют прием повторного промывания (Рис. 5А). Для этого осадок органелл суспендируют в среде промывания и центрифугируют в течение такого времени и при тех ускорениях, которые были использованы для осаждения данной фракции.

Очистка полученной фракции путем центрифугирования в градиенте плотности. Суспензия промытых митохондрий может быть использована для очистки в градиенте сахарозы, перколла и других веществ. В настоящее время для очистки митохондрий используют перколл. Суть метода состоит в наложении суспензии неочищенных митохондрий на поверхность градиента и центрифугирования при высоких режимах ускорения. Под действием центробежной силы компоненты митохондриальной фракции проходят через градиент перколла и разделяются на отдельные зоны (полосы) в соответствии с их относительной плотностью (Рис 5Б). Можно использовать как непрерывный самообразующийся градиент, так и прерывистый. Использование нетоксичного перколла позволяет проводить быструю очистку митохондрий в изотонических условиях. Перколл, представляющий собой взвесь коллоидных частиц силикагеля (диаметр 15-30нм), покрытых поливинилпирролидоном (ПВП), почти идеальный материал для разделения митохондрий высших растений. В отличие от сахарозы он не дает отрицательных осмотических эффектов. Поэтому субклеточные органеллы образуют полосы при плотности более низкой, чем в сахарозном

градиенте. Кроме того, ПВП, покрывающий частицы силикагеля, может активно связывать гидролазы. Концентрации растворов перколлы, используемых для создания градиента (объем/объем), и режимы центрифугирования необходимо тщательно подбирать соответственно происхождению митохондрий и природе загрязнений.

Определение чистоты и качества полученного препарата митохондрий. Определение чистоты и качества полученной фракции митохондрий можно проводить различными путями: 1) по величинам дыхательного контроля по Чансу – Вилльямсу (ДК) и отношения АДФ/О; 2) путем определения ферментативной активности фракции (по наличию активности ферментов-маркеров митохондрий и отсутствию активности ферментов-маркеров, свидетельствующих о наличии немитохондриальных компонентов); 3) путем электронномикроскопического исследования. Об интактности митохондрий чаще всего судят по проницаемости наружной мембраны для цитохрома *c* и отсутствию активности ферментов матрикса, таких как малатдегидрогеназа и фумараза.

Определение активности цитохром *c* оксидазы. Активность цитохром *c* оксидазы (ЕС 1.9.3.1) измеряют при комнатной температуре (Tolbert, 1974) по окислению восстановленного цитохрома *c* при 550 нм в среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,2), 10 мМ KCl, 50 мкМ цитохрома *c* (предварительно восстановленного гидросульфатом натрия), 0,2% Тритон X-100 и 100-150 мкг митохондриальной фракции. Активность цитохром *c* оксидазы рассчитывают по формуле (Wharton, Tzagoloff, 1967):

$$A = 2,3 \log \frac{E_{t1}}{E_{t2}} \times \frac{c}{\Delta t W}, \text{ где}$$

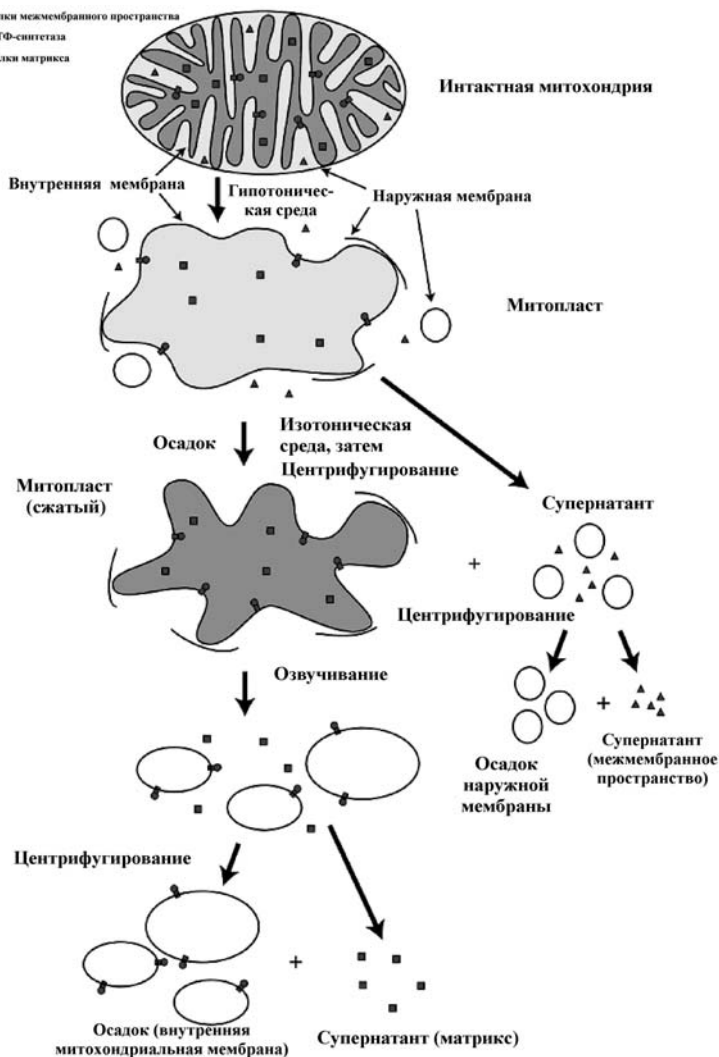


Рис. 6. Схема получения субмитохондриальных фракций (по Guillot-Salomon et al., 1997; Побежимова и др., 2001).

Где:

A- активность фермента, выраженная в мкм/мин/мг белка;

E_{t1} -начальная оптическая плотность;

E_{t2} -оптическая плотность через определенное время;

Δt - время, мин;

c- концентрация цитохрома c, мкМ;

W- количество белка, мг.

Целостность наружной мембраны митохондрий определяют последовательными измерениями активности цитохром c оксидазы в отсутствии и присутствии 0,2% Тритона X-100. Содержание белка в различных фракциях митохондрий определяют по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Получение мембранных фракций и матрикса митохондрий. Для получения мембранных фракций митохондрий и матрикса используют очищенные с помощью перколлы митохондрии, изолированные из побегов проростков озимой пшеницы. Отделение внешней мембраны осуществляют согласно методу «сжатие – набухание – сжатие» (Рис. 6) (Guillot-Salomon et al., 1997; Побежимова и др., 2001). Для этого к суспензии очищенных митохондрий (приблизительно 50-80 мг белка/мл) добавляют раствор 2 М сахарозы в соотношении 1:1. Сжатие митохондрий проводят при 0°C в течение 1ч. Полученную суспензию сжатых митохондрий быстро вводят (с помощью шприца) в среду, содержащую 5 мМ KH_2PO_4 и 2 мМ ЭДТА, pH=7,2. Соотношение суспензии митохондрий и среды должно быть 1:40. Набухание митохондрий проводят в течение 20 мин при постоянном перемешивании на холоду. Сжатие митопластов (матрикса, окруженного внутренней мембраной) осуществляют путем добавления к суспензии набухших митохондрий среды, содержащей 2 М сахарозу и 5 мМ MgCl_2 в соотношении 9:1. После инкубации в течение 20 мин при 0°C суспензию митохондрий 10 мин центрифугируют при 15000 g для осаждения митопластов. Для осаждения наружной мембраны супернатант центрифугируют при 100000 g в течение 1ч. Митопласты промывают средой выделения

при +2⁰С и разрушают на установке УЗДН-1 в течение 2 мин с интервалом 20 сек (Азарашвили и др., 1997). Суспензию, полученную в результате обработки ультразвуком, центрифугируют при 10000 g в течение 5-10 мин для осаждения неразрушенных митопластов. После этого супернатант центрифугируют при 100000 g в течение 1ч, в результате чего получают внутренние мембраны (осадок) и матрикс (супернатант).

Определение активности ферментов-маркеров в полученных фракциях митохондриальных структур. Для определения активности ферментов-маркеров используют начальную скорость реакции на линейном участке, когда изменение оптической плотности является постоянным в единицу времени.

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A=V \frac{\Delta E}{D \Delta t \xi \text{ мг белка}},$$

Где:

A - активность фермента;

V - объем раствора в спектрофотометрической кювете;

ΔE - изменение оптической плотности;

Δt - время в мин;

ξ - коэффициент молярной экстинкции;

d - ширина кюветы;

Умножая полученную концентрацию на 10³, получают активность в нмоль/мин на мг белка (Bergmeyer, 1965).

Для измерения оптической плотности используют спектрофотометр (СФ 46). Все измерения проводят в кювете спектрофотометра объемом 2 мл и шириной 1 см. Для определения ферментативной активности используют следующие реакционные среды и условия:

НАДН- цитохром с оксидоредуктаза.

Активность фермента оценивают по скорости восстановления цитохрома с при длине волны 550 нм при комнатной температуре в среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 10 мМ MOPS-KOH, 5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4 (Среда А), 5 μ М цитохром с, 1мМ KCN и 0,1-1,0 мг белка пробы. Измерение оптической плотности производят через 15 сек после добавления 1 мМ НАДН. Конечная концентрация антимицина А составляет 0.5 мкг/мл. При расчете активности фермента используют коэффициент экстинкции для цитохрома с: $\zeta_{550} = 19,6 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Moore and Proudlove, 1983).

Малатдегидрогеназа.

Активность фермента оценивают по скорости окисления НАДН при длине волны 340 нм. Реакционная среда состоит из Среды А, 0,2 мМ НАДН, 1 мМ KCN и 0,5-1,5 мг белка пробы. Падение оптической плотности определяют после добавления 1 мМ щавелево-уксусной кислоты, производя измерения через каждые 30 сек. Коэффициент экстинкции для НАДН: $\zeta_{340} = 6,22 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Moore and Proudlove, 1983).

Фумараза.

Активность фермента определяют по скорости образования фумарата при длине волны 240 нм. Состав реакционной среды: 50 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ малат, pH 7,4. За ходом реакции следят по увеличению оптической плотности после добавления 0,1 - 1 мг белка пробы в течение 3 мин. Коэффициент экстинкции для фумарата: $\zeta_{240} = 2,44 \times 10^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Moore and Proudlove, 1983).

Рабочая методика выделения митохондрий из этиолированных проростков

1. *Приготовление рабочих растворов (среды выделения, промывания, ресуспендирования, инкубации).* Доведение pH до

необходимого значения осуществляется с помощью 40% КОН (до значения pH 7,0) и более осторожно 20% КОН до pH 7,35-7,4. При необходимости используют конц. HCl.

Среда выделения (является основой для приготовления всех сред), pH 7,4

Компоненты	Концентрация	Количество вещества в г/100мл
Сахароза	300 мМ	10,260
MOPS	40 мМ	0,837
ЭДТА	5 мМ	0,186
KCl	10 мМ	0,075
MgCl ₂	1 мМ	0,009
цистеин	0,05%	0,050
БСА	0,1%	0,100

Среда промывания, pH 7,4 состоит из тех же компонентов что и среда выделения, за исключением цистеина. Концентрация БСА составляет 0,4%.

Среда ресуспендирования, pH 7,4 имеет такой же состав, что и среда промывания, но не содержит БСА. В некоторых случаях дополнительно включают 4 мМ АТФ, 6 мМ АДФ и субстрат окисления.

Раствор 20% БСА готовится на среде промывания и хранится в морозильной камере.

Последовательность приготовления сред для выделения митохондрий следующая. Допустим необходимо приготовить среды для выделения митохондрий из 30 грамм растительной ткани. Вначале рассчитывается необходимый объем всех сред. Среда

выделения рассчитывается, исходя из соотношения: 1:4, то есть на 30 г нужно 120 мл среды. Среда промывания готовится 20 мл (из них 10-12 мл используется). Среда ресуспендирования готовится в объеме 10 мл (к митохондриям добавляется 0,6 мл). Объемы всех сред суммируют (в данном случае общий объем равен 150 мл – на это объем необходимо рассчитать количество веществ в г, являющихся компонентами сред). В стеклянном стакане растворяют указанные компоненты, за исключением цистеина, доводят до нужного объема бидистиллированной водой и доводят pH (при постоянном перемешивании). Затем раствор фильтруют, отливают объем, необходимый для среды промывания и для среды ресуспендирования. В среду ресуспендирования добавляются необходимые компоненты, доводится pH. В оставшуюся после фильтрации среду (объем среды выделения) добавляется цистеин, все перемешивается, доводится pH и среда фильтруется. Растворы остаются в холодильнике до охлаждения.

Все среды готовятся накануне выделения митохондрий и на ночь оставляются в холодильнике. На следующий день в среду выделения добавляется цистеин (50 мг/100 мл), проверяется и доводится до соответствующих значений pH всех сред. Щелочь и кислота добавляются стеклянной палочкой (первоначально при добавлении большого объема щелочи в среду выделения используется капельница). Каждый раз перед новым добавлением палочка обмывается бидистиллированной водой и обсушивается фильтровальной бумагой. При доведении pH осуществляется постоянное перемешивание растворов на магнитной мешалке. После получения нужных значений pH растворы помещают в кристаллизатор со льдом и ставят в холодильник.

2. Ход выделения. Выделение митохондрий проводится из 30 г этиолированных побегов 3-х суточных проростков озимой пшеницы. Проростки выращиваются в кювете на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 26⁰С.

Нарезанные побеги длиной 2-3 см промываются дистиллированной водой, обсушиваются и помещаются на несколько минут в холодильник (0°C). Затем растительный материал высыпается в стакан для пресса, замороженный в лед, и заливается средой выделения (общий объем среды выделения 120 мл, но в стакан заливается половина этого объема). В среду выделения предварительно добавляют раствор БСА (0,6 мл 20% раствора БСА на 120 мл среды выделения = 0,1% БСА). Навеска быстро измельчается ножницами и продавливается под прессом.

Полученный гомогенат фильтруется через несколько слоев капроновой ткани, заливается оставшейся средой выделения и отжимается в химический стакан с воронкой. После чего разливается по шести центрифужным пробиркам, которые попарно уравниваются. В течение всей процедуры выделения химический стакан с воронкой и капроновой тканью, центрифужные пробирки находятся в криостате. Криостат (Рис. 4) включают за 30 мин до выделения митохондрий, предварительно разместив там всю необходимую посуду. Температура в криостате должна поддерживаться в пределах $0 - 4^{\circ}\text{C}$. Уравновешенные пробирки центрифугируются при 7500 об/мин в течение 3 мин на центрифуге К-24 в угловом роторе. Время регистрируется по секундомеру после доведения оборотов до нужного значения. Надосадочная жидкость (супернатант) быстро и осторожно переливается в чистые охлажденные центрифужные пробирки, уравнивается и центрифугируется при 15000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант сливается и отбрасывается. Центрифужные пробирки опрокидывают на фильтровальную бумагу, чтобы дать стечь оставшейся жидкости. Одну центрифужную пробирку помещают в стаканчик со льдом, заливают половиной объема среды промывания и аккуратно промывают осадок с помощью охлажденной кисточки. Общий объем среды промывания 12 мл (перед промыванием в среду добавляется 0,3 мл 20% БСА на 12 мл среды = 0,4% БСА). Сливают промытый осадок в следующую

пробирку с осадком, опять промывают и так до тех пор, пока не останется только одна пробирка. Оставшейся средой вторично промывают уже промытые пробирки и сливают в одну. Центрифужную пробирку уравнивают такой же пробиркой, наполненной водой и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант сливается и отбрасывается, а осадок ресуспендируется с помощью кисточки в 0,6 мл охлажденной среды ресуспендирования. Пробирка с суспензией митохондрий помещается в стакан со льдом и используется для работы. Суспензию митохондрий можно хранить в холодильнике в течение 30-60 мин.

Выделение и очистка растительных митохондрий в градиенте плотности перколла. Все операции по выделению митохондрий проводят также как и в первой методике, лишь с небольшими изменениями. Соотношение навески растительного материала (г) и объема среды выделения (мл) составляет 1:3. Для выделения митохондрий используют среду, содержащую 300 мМ сахарозу, 40 мМ MOPS-KOH (pH 7.4), 2мМ ЭДТА, 0.5% цистеин и 0.1% БСА. Для промывания митохондрий используют среду выделения (pH 7.4), из состава которой исключают цистеин. Суспензию промытых митохондрий (60-90 мг белка) ресуспендируют в 1-1.5 мл среды ресуспендирования, состоящей из 300 мМ сахарозы и 40 мМ MOPS-KOH (pH 7.4),

Очистку органелл проводят в градиенте перколла. В работе используют экспериментально подобранную модификацию метода очистки митохондрий в ступенчатом градиенте перколла (Побежимова и др., 2001), приготовленном на среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 10 мМ MOPS-KOH (pH 7.4) и 0.1% БСА. Градиент состоит из 3, 14 и 8 мл 18, 23, 35% (объем/объем) перколла ("Sigma", США), соответственно. Суспензию промытых митохондрий наслаивают на градиент перколла и центрифугируют при 22000g в течение 45 мин. При фракционировании митохондрий получают четыре фракции клеточных компонентов. Фракция

интактных митохондрий находится на границе 23 и 35% перколла. Освобождение митохондрий от перколла осуществляют разбавлением последнего в 20 раз средой ресуспендирования (объем/объем). Осаждение митохондрий из разбавленной суспензии проводят при 24000g в течение 10 мин. Осадок очищенных митохондрий повторно промывают 10 объемами среды ресуспендирования и пересаживают в течение 5 мин при 24000g. Очищенные таким образом митохондрии имеют высокую степень интактности (около 95%) и не загрязнены другими субклеточными фракциями.

Литература

- Азарашвили Т.С., Кудин А.П., Полтева Н.А., Кудзина Л.Ю., Евтодиенко Ю.В. Полипептидный состав субмитохондриальных фракций нормальной ткани печени и гепатомы Зейделя // Биохимия. - 1997. - Т.62. - С.833-841.
- Андреева И.Н. Методы выделения физиологически активных митохондрий из растительных тканей // Клетка и клеточные структуры / Отв. ред. Молотковский Ю.Г. – М.: Наука, 1968. – С.16-24.
- Войников В.К. К вопросу о выделении интактных растительных митохондрий // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР. Сер. биол. наук. – 1980. - Т.10, вып.2. - С.121-125.
- Войников В.К., Константинов Ю.М., Негрук В.И. генетические функции митохондрий растений. – Новосибирск: Наука, 1991. – 183 с.
- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2-х т. Т.1. Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – С.65-70.
- Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиоосмотическую теорию. – М.: Мир, 1985. – 190 с.
- Побежимова Т.П., Грабельных О.И., Колесниченко А.В., Сумина О.Н., Войников В.К. Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в

- митохондриях озимой пшеницы // Физиол. Раст. – 2001. – Т.48, №2. – С. 238-244.
- Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. – М.: Мир, 1979, - 216 с.
- Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989. – 553 с.
- Соттоказа Дж. Выделение митохондрий и митохондриальных мембран / В кн.: Биохимическое исследование мембран. – М.: Мир, 1979. – с.54-74.
- Хохлова Л.П. Выделение и изучение энергетических функций митохондрий растений: Методические разработки. – Казань: Изд-во Казанского университета, 1988. – 24С.
- Шугаев А.Г., Выхребенцева Э.И. Выделение интактных митохондрий из корнеплода сахарной свеклы // Физиол. раст. – 1982.- Т.29, вып.4. – с.799-803.
- Bergmeyer H.-U. ed. Methods of enzymatic analysis // Mew York, London. – 1965. – 1064 P.
- Davy de Virville J., Aaron I., Alin M. F., Moreau F. Isolation and properties of mitochondria from *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures // Plant Physiol. Biochem. - 1994. - V.32. - P.159-166.
- Day D.A., Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria // Plant Physiol. - 1994. - V.106. - P.1421-1426.
- Douce R. Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis. - London: Acad. Press, 1985. - 327 p.
- Guillot-Salomon T., Remy R., Cantrel C., Demandre C., Moreau F. Phospholipids and Polypeptides in the Outer Membrane of Maize Mitochondria // Phytochemistry. - 1997. - V.44. - P.29-43.

- Moller I.M. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases // *TRENDS in Plant Science*. – 2002. -V.7. – P.235-237.
- Moore A.L., Proudlove M.O. Mitochondria and sub-mitochondrial particles // *Isolation of membranes and organelles from plant cells* / Eds. Hall T.L., Moore A.L. London: Acad. Press. - 1983. - P.153-184.
- Tolbert N.E. Isolation of sub-cellular organelles of metabolism on isopicnic sucrose gradients // *Methods Enzymol.* 1974. V.31. P.734-746.
- Wharton D.C., Tzagoloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria // *Methods Enzymol.* – 1967. – V.10. – P. 245-250.

1.2 МЕТОД ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ

Принцип полярографического метода. Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий проводится с использованием полярографического метода измерения дыхания. Полярографический метод характеризуется быстротой, большой чувствительностью, автоматической регистрацией полученных результатов. Метод основан на реакции восстановления на катоде при наложении разности потенциалов 0,6-0,8 В. Возникающий при этом ток служит мерилем концентрации кислорода в среде и регистрируется при помощи полярографа (Рис. 9) (Руководство..., 1973; Зеленский, 1986).

Для полярографических работ применяется схема, состоящая из источника питания, ячейки и сопротивления, с которого снимается напряжение на самопишущий потенциометр (Рис. 7).

Чтобы предотвратить инактивацию, вызываемую отложением на катоде белков и других соединений, Кларком предложено покрывать катод полимерной пленкой, проницаемой только для газов. В настоящее время широко используется следующая конструкция полярографической ячейки (Рис. 8). В ячейке используется неподвижный платиновый электрод, отделенный от исследуемого раствора полимерной пленкой, проницаемой для кислорода (Руководство..., 1973; Зеленский, 1986).

Термостатирование осуществляется потоком жидкости внутри ячейки, раствор перемешивается магнитной мешалкой, расположенной над пленкой, покрывающей электроды (Рис. 7). Рабочим катодом, на котором восстанавливается кислород является платина, а электродом сравнения – серебро (Рис. 8). Электроды совмещены в одном блоке из тефлона, который выполняет роль крышки и входит в ячейку как поршень. Объем ячейки 1,4 мл. Ячейки из плексигласа размещаются в гнездах термостатируемой камеры, находящейся на электромагнитной мешалке. Внутри ячеек располагаются магнитики, при помощи которых осуществляется перемешивание. Митохондрии вносятся в ячейку быстро через паз тефлонового блока.

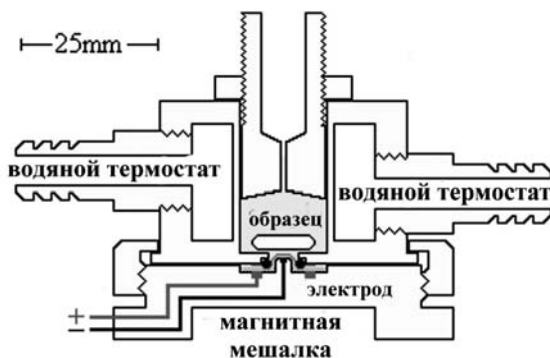


Рис. 7. Схема устройства ячейки полярографа



Рис. 8. Схема устройства электрода полярографической ячейки

Определение окислительного фосфорилирования чаще всего проводится по методу Чанса-Вильямса (Chance, Williams, 1956). Метод основан на том, что в отсутствии АДФ фосфорилирование не идет. Окисление же имеет определенную величину. При добавлении АДФ в инкубационную среду начинает идти фосфорилирование и происходит стимулирование окислительной активности митохондрий. Когда весь АДФ превратится в АТФ, окислительная активность снижается. P/O рассчитывается по отношению молярного количества добавленного АДФ к количеству стимулированного им поглощения кислорода ($P/O = \text{АДФ}/O$). При определении окислительного фосфорилирования необходимо учитывать дыхательный контроль (ДК) – отношение скорости окисления в присутствии АДФ к скорости окисления после истощения АДФ (Estabrook, 1967).

Понятие о метаболических состояниях митохондрий. В зависимости от скорости переноса электронов, природы факторов, лимитирующих дыхание и степени восстановленности переносчиков выделяют пять метаболических состояний митохондрий (Estabrook, 1967):

1) **состояние 1** или эндогенное дыхание наблюдается в отсутствии субстратов окисления и акцептора фосфата - АДФ;

2) **состояние 2** или «субстратное» характеризуются присутствием субстрата окисления, но отсутствием АДФ;

3) **состояние 3** или активное фосфорилирующее (энергизованное) состояние наблюдается в присутствии субстрата окисления и АДФ, когда дыхание митохондрий резко активируется, в этом состоянии скорость дыхания ограничивается скоростью проникновения субстратов в митохондрии и мощностью ферментов фосфорилирующего окисления. В этом состоянии происходит сопряженное с окислением субстрата фосфорилирование АДФ;

4) **состояние 4** или нефосфорилирующее состояние характеризуется торможением дыхания вследствие истощения добавленного АДФ, при этом скорость окисления ограничивается недостатком АДФ. В этом состоянии потребление кислорода митохондриями связано с утечкой протонов через внутреннюю мембрану и функционированием нефосфорилирующих путей транспорта электронов;

5) **состояние 5** развивается в анаэробных условиях, когда в ячейке электрода истощается запас кислорода.

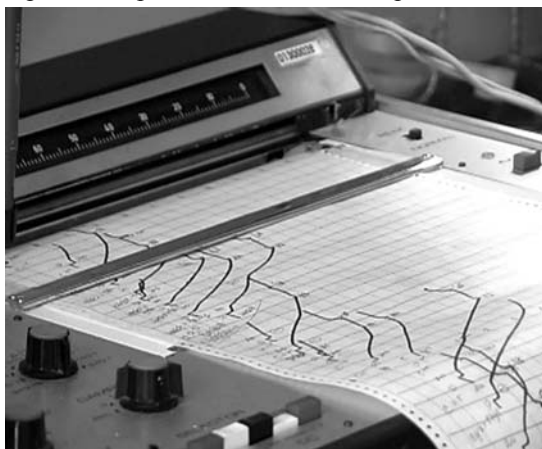


Рис. 9. Внешний вид полярографа ОН 105

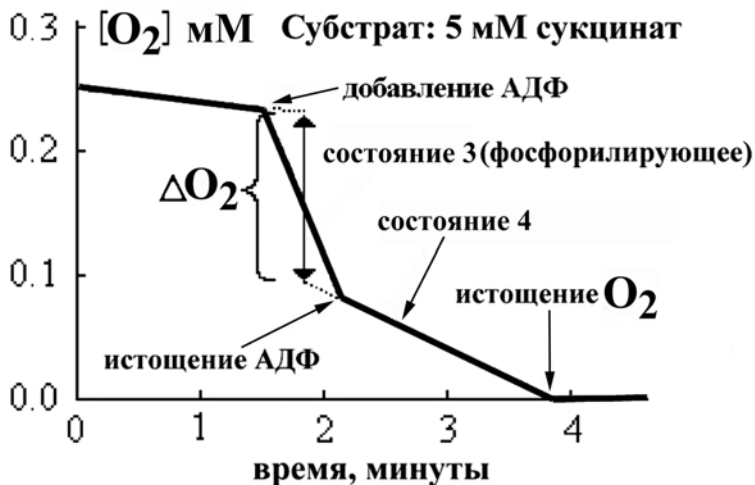


Рис. 10. Полярографическая регистрация потребления кислорода митохондриями в разных метаболических состояниях

Применение ингибиторного анализа для изучения отдельных звеньев дыхательной цепи. Специфические ингибиторы являются важным инструментом при изучении последовательности и механизмов реакций фосфорилирования в дыхательной цепи. Согласно Рэкеру (1979), существует три класса соединений, препятствующих окислительному фосфорилированию: 1) ингибиторы окислительной цепи (цианид, антимицин); 2) разобщители, препятствующие запасу энергии и стимулирующие рассеивание её в виде тепла (2,4-динитрофенол, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон); 3) ингибиторы переноса энергии, которые препятствуют превращению энергии окисления в АТФ, ингибируя перенос энергии (олигомицин, рутамицин). Ингибиторы **комплекса I** – ротенон, пирицидин, амитал, реин (субстрат окисления – 10 мМ малат + 10 мМ глутамат). Ингибиторы **комплекса II** – теноилтрифторацетон (ТТФА), малонат, оксалоацетат (субстрат

окисления* – 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат). Ингибитор **комплекса III** – антимицин А (20 мкМ) (субстрат окисления* – 1 мМ НАДН**). Ингибиторы **комплекса IV** – цианид (0.4 мМ), азид, оксид углерода (II) (субстрат окисления* – 0.2 мМ ТМФД + 2 мМ аскорбат). **Ингибитор АТФ-азы** – олигомицин (2.5 мкг на 1 мг митохондриального белка). **Ингибиторы альтернативной оксидазы** – бензгидроксамовая кислота (БГК) (1 мМ), припилгаллат (0.2 мМ), дисульфирам.

* - при использовании этих субстратов в ячейку дополнительно вносят ротенон.

** - среда инкубации при окислении НАДН не содержит ЭДТА, но включает ионы Ca^{2+} (конечная концентрация CaCl_2 составляет 0.06 мМ).

Рабочая методика полярографического определения дыхания

1. Приготовление реакционной среды.

Реакционная среда (среда инкубации), pH 7,4.

Компоненты	Концентрация	Количество вещества в г/100мл
KH_2PO_4	18 мМ	0,245
KCl	125 мМ	0,932
ЭДТА	5 мМ	0,186
MgCl_2	1 мМ	0,009

Среду инкубации можно приготовить накануне выделения и хранить в холодильнике. Перед использованием ее заливают в чистый стеклянный цилиндр, фиксируют на штативе, установленном в водяном термостате. Таким образом, среда инкубации находится при постоянной температуре (обычно 26⁰С). Непосредственно перед началом полярографического определения

(за 5 мин) включают воздушный компрессор, чтобы среда была насыщена кислородом.

2. *Подготовка полярографа к работе.* Включают термостат, полярограф и лампу, освещающую ячейку. Проверяют целостность полимерной пленки (обычно используется полиэтилен толщиной 10-100 микрон), при необходимости ее нужно заменить. Для этого откручивают кольцо, снимают кожух, освобождают от смазки, натягивают пленку (промытую дистиллированной водой и спиртом), прочно завязывают ниткой, смазывают поверхность под пленкой вакуумной смазкой, надевают кожух, закручивают кольцо, заливают хлористый калий в корпус. В корпус электрода с залитым электролитом вставляют сердечник с электродом. Собранный электрод вставляют в ячейку и проверяют целостность мембраны. После замены пленки электрод нужно выдержать в рабочем состоянии в течение 1 ч (Зеленский, 1986).

С целью стабилизации электрода и уменьшения дрейфа за 30 мин до начала опыта электрод выдерживается при рабочем напряжении (0,6-0,65В) в бидистиллированной воде (вода наливается в ячейку) при той температуре, при которой проводятся измерения (обычно 26⁰С). Затем в ячейку наливается среда инкубации, вставляется электрод, включается мешалка и 10-15 мин электрод должен постоять. Затем ведется запись до полного отсутствия дрейфа.

Записываемая линия должна быть почти без наклона. После этого определяется предельный ток диффузии (линия разрыва в мм диаграммной ленты), соответствующий объему кислорода, который растворяется в данном объеме при определенной температуре. Линия разрыва снимается не менее трех раз путем отведения одной из клемм электрода. При хорошей чувствительности полярографа линия разрыва обычно составляет 220-240 мм.

3. *Измерение поглощения кислорода.* Полярографическая ячейка объемом 1,4 мл заполняется термостатированной,

насыщенной кислородом средой инкубации. Вставляется электрод, ячейка помещается в термостатирующую камеру, в которой поддерживается постоянная температура (26°C) с помощью водяного термостата. Перемешивание раствора осуществляется на магнитной мешалке с помощью кусочка стальной проволоки, запаянной в стекло. Анализ окислительной активности митохондрий проводится в мягких условиях (сначала в ячейку вносят субстрат окисления, а затем добавляют митохондрии). С помощью автоматической микропипетки в ячейку вносят субстрат (например 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата). Включается самописец (скорость записи 2 см/мин), записывается прямая линия, в ячейку вносят суспензию митохондрий (50 мкл), содержащую около 0,7-1,0 мг митохондриального белка. В течение 1-1,5 мин измеряется дыхание во втором субстратном состоянии. Затем добавляют 200 мкМ АДФ и регистрируют стимуляцию дыхания в фосфорилирующем состоянии (состояние 3) и торможение дыхания в нефосфорилирующем состоянии после истощения АДФ (состояние 4). Через 1-2 мин вновь стимулируют дыхание добавлением АДФ, и так можно наблюдать несколько циклов фосфорилирования, вплоть до истощения кислорода в ячейке.

4. *Расчет показателей энергетической активности митохондрий.* Из полярограмм рассчитывают скорость поглощения кислорода во втором субстратном состоянии (V_2), в третьем фосфорилирующем состоянии (V_3) и четвертом нефосфорилирующем (V_4). Скорость дыхания выражается в нмоль $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$ белка. Отношение скорости фосфорилирующего дыхания к скорости нефосфорилирующего дыхания характеризует коэффициент дыхательного контроля (ДК) по Чансу-Вильямсу, по величине которого можно судить о степени сопряженности окисления и фосфорилирования, а также о степени интактности митохондриальных препаратов.

Для того чтобы рассчитать дыхательные параметры митохондрий необходимо знать: длину шкалы в мм (от начала кривой поглощения кислорода до полного его истощения), количество митохондриального белка в мг, растворимость кислорода при определенной температуре (при 26⁰С, в ячейке объемом 1,4 мл она составляет 336 нмоль О₂) и количество добавленного АДФ. Вначале по полярографической кривой определяется скорость поглощения кислорода в мм за 1 мин (в состоянии 3 и в состоянии 4). Затем растворимость кислорода делится на длину шкалы (например, 336 нмоль О₂ разделить на 220 мм), полученный коэффициент А (1,53 нмоль О₂/мм) делится на количество митохондриального белка (1,53 разделить на 0,8 мг = 1,91 нмоль О₂/ мм/ мг) – получим коэффициент Б. Коэффициент Б умножают на скорость поглощения кислорода, выраженную в мм за 1 мин (например 1,91 нмоль О₂/мм/мг*20 мм= 38,18 нмоль О₂/мин/мг).

Отношение количества фосфорилированного АДФ к количеству утилизированного при этом кислорода рассчитывают следующим образом (Хохлова, 1988). На полярографической ленте измеряют (в мм) расстояние С, соответствующее всему количеству поглощенного кислорода в состоянии 3 (от момента добавления АДФ до перехода в состояние 4).

$$\frac{\text{Количество АДФ (мкМ)} \dots \dots \dots}{2 \times \text{коэфф. А (нмоль О}_2\text{/ мм)} \times \text{С (мм)}}$$

Пример расчета отношения АДФ:О:

$$\frac{200 \text{ мкМ АДФ} \dots \dots \dots}{2 \times 1,53 \text{ нмоль О}_2\text{/ мм} \times 26 \text{ мм}} = 2,51 \text{ мкМ/нاتم}$$

Литература

Зеленский М.И. Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. – Л.: Наука, 1986

- Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М.: Наука, 1973. – 222С.
- Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды / Пер. с англ. М.И. Гольштейн. – М.: Мир, 1979. – 214С.
- Хохлова Л.П. Выделение и изучение энергетических функций митохондрий растений: Методические разработки. – Казань: Изд-во Казанского университета, 1988. – 24С.
- Chance B.W., Williams V.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. – 1956. – V.17, N1. – P.65-132.
- Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratio // Methods in Enzimology. – 1967. – V.10. – p.41-47.

2 ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Белки, или протеины (в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие» – один из основных классов биологических макромолекул. Белки – это наиболее многочисленные и исключительно разнообразные по своим функциям макромолекулы.

Все белки во всех организмах, независимо от их функции и биологической активности, построены из одного и того же основного набора 20 аминокислот, каждая из которых, взятая в отдельности, не обладает свойственной нативным белкам биологической активностью. Аминокислоты – это алфавит белковой структуры; соединив их в различном порядке, можно получить почти бесконечное число последовательностей и, значит, почти бесконечное множество разнообразных белков.

В водных нейтральных растворах α -аминокислоты находятся в виде цвиттериона. Каждая из аминокислот, за исключением пролина, содержит общий фрагмент $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH}$, так что

различаются они только боковой группой R, прикрепленной к α -углеродному атому. Все аминокислоты в белках имеют L-конфигурацию (кроме глицина, в молекуле которого нет асимметрического атома).

Две аминокислоты можно соединить вместе, если отщепить от них молекулу воды. При этом образуется дипептид. Связь $-\text{CO}-\text{NH}-$ называют пептидной связью. В дипептиде есть концевые амино- и карбоксильная группы; поэтому к нему можно присоединять все новые аминокислоты, переходя таким образом к полипептиду

Хотя четкого разграничения не существует, короткие цепи принято называть пептидами или олигопептидами (олиго- значит несколько), а под полипептидами понимают обычно цепь из 80-ти и более аминокислот.

Терминология. Участок цепи, на котором находится концевая NH_3^+ -группа называют N-концевым, а противоположный ему – C-концевым. Цепь без аминокислотных радикалов ($-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$) именуют **полипептидным скелетом**, аминокислоту, включенную в белок, - **аминокислотным остатком**, а аминокислотные радикалы R – **боковыми цепями** аминокислот, боковыми цепями белка или просто боковыми цепями. Порядок расположения аминокислот в полипептиде называют **аминокислотной последовательностью**. Процедуру установления этой последовательности по-английски называют *секвенированием*. Секвенирование играет очень важную роль в химии белка. Аминокислотная последовательность составляет **первичную структуру** белка. Фред Сэнгер в Кембридже первым определил аминокислотную последовательность белка (инсулина) и был удостоен в 1958 г. Нобелевской премии. Для определения аминокислотного состава белка имеются приборы – аминокислотные анализаторы. Работа их автоматизирована и для анализа требуется всего 0,001 мкг белка.

Уровни структурной организации белка: от первичной структуры – к четвертичной.

Последовательность аминокислот, ковалентно связанных в полипептидную цепь, называется первичной структурой белка. Полипептидная цепь принимает специфическую конформацию, известную как вторичная структура белка, которая в свою очередь укладывается в компактное образование, именуемое третичной структурой. Такое образование, сформированное первичной, вторичной и третичной структурами, может представлять собой либо самостоятельный белок, либо в качестве мономера (субъединицы) ассоциироваться с такими же или другими мономерами, образуя сложный мультимерный белок. Под четвертичной структурой понимают расположение в пространстве взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепями белка (Рис. 11).

Вторичной структурой называют пространственное расположение атомов главной цепи белка на отдельных ее участках. Согласно более раннему определению, вторичная структура – это те сегменты полипептидной цепи, которые участвуют в формировании регулярной сетки водородных связей. В соответствии с этими определениями любой участок белка имеет вторичную структуру. Иногда рассматривают как вторичную структуру только те ее элементы, которые являются периодическими: α -спираль и β -структуру. Однако в белках нередко встречаются такие участки пептидной цепи, которые уложены вполне определенным способом, хотя их пространственная структура не содержит какого-либо периодически повторяющегося, регулярного мотива. Тем не менее к ним вполне приложимо понятие вторичной структуры. Следует различать два вида вторичных структур: регулярные и нерегулярные.

Понятие вторичной структуры относится не ко всей белковой молекуле в целом, а к отдельным, более или менее протяженным участкам ее полипептидной цепи. Вклад боковых аминокислотных

групп в упаковку белковой молекулы при этом не рассматривается (Рис. 11b).

Пептидная цепь содержит множество C=O- и N-H- групп пептидных связей, каждая из которых потенциально способна участвовать в образовании водородных связей. До тех пор пока это потенциальное связывание не произойдет структура будет неустойчива. Партнерами для связывания этих групп являются другие такие же группы из той же или соседней полипептидной цепи. При этом образуются два главных типа структур: α -спираль, в которую цепь сворачивается как шнур от телефонной трубки, и β -структура, в которой бок о бок уложены вытянутые участки одной или нескольких цепей. Обе эти структуры весьма стабильны; они встречаются на периферии белковых глобул (где расположены гидрофильные боковые группы аминокислот) и в их внутренней области (где расположены гидрофобные боковые группы).

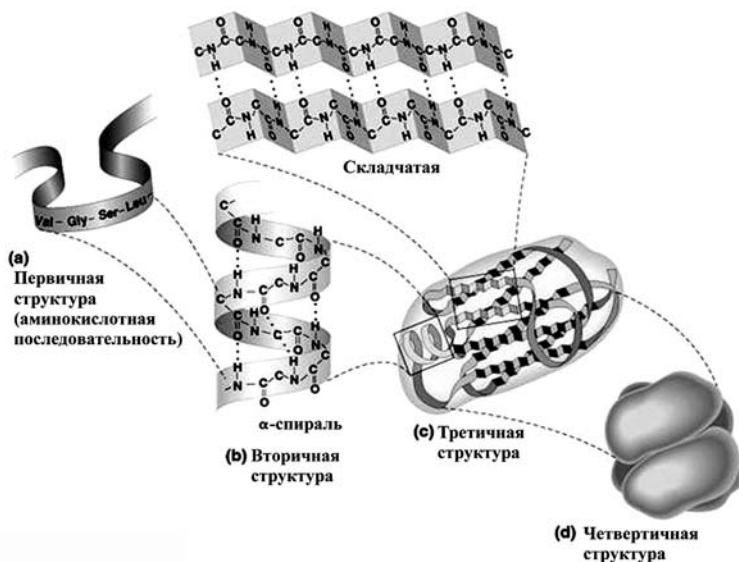


Рис. 11. Уровни организации структуры белка

α -Спираль – термин α -спираль был введен Полингом и Кори. На один виток α -спирали приходится 3,6 аминокислотных остатков. Это означает, что группа C=O одной пептидной связи образует водородную связь с группой N-H другой пептидной связи, отстоящей от первой на четыре аминокислотных остатка. И C=O, и N-H связи направлены параллельно оси спирали и попарно противостоят друг другу. Такое их расположение оптимально для образования водородной связи и, следовательно, для стабилизации α -спирали. В поперечном сечении α -спираль выглядит диском, от которого наружу смотрят боковые цепи аминокислот.

β -Складчатый слой – это тоже стабильная структура.

Принцип организации прост. Полипептидная цепь находится в растянутом состоянии, а ее C=O- и N-H-группы связаны водородными связями с такими же группами соседней, параллельно ориентированной полипептидной цепи. Полипептидные цепи могут быть направлены в одном и том же или в противоположном направлениях: в первом случае складчатый слой называют параллельным, а во втором - антипараллельным.

Дальнейшая укладка вторичных структур в компактную структуру глобулярного белка носит название третичной структуры (Рис. 11с).

Для построения белков может быть использована любая комбинация спиралей, складчатых слоев и петель. При этом должны выполняться следующие требования: усилено образование водородных связей и сведены к минимуму контакты гидрофобных групп. Ведущую роль в формировании третичной структуры играют гидрофобные взаимодействия. Попав в воду, гидрофобные радикалы аминокислот стремятся уйти от контакта с H₂O, они уходят внутрь молекулы, образуя гидрофобное ядро (жирную каплю). Цепь изгибается, занимает определенное положение и фиксируется всеми типами связей. Белковая молекула формирует глобулу с «жирным пятном» внутри, а на поверхности находятся

гидрофильные и заряженные радикалы аминокислот (они более активны).

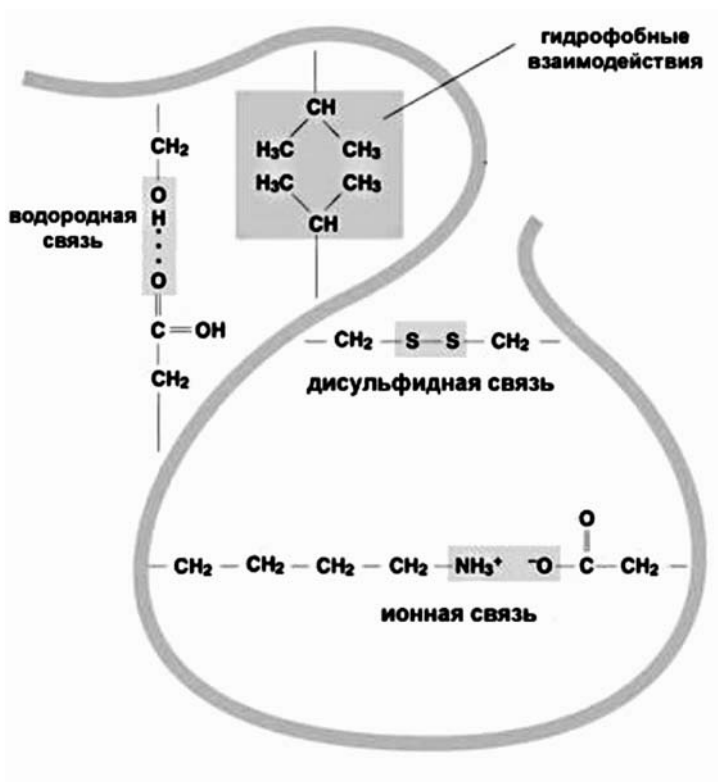


Рис. 12. Силы, поддерживающие третичную структуру белка

Силы, поддерживающие третичную структуру: 1) ковалентная дисульфидная связь (самая прочная); 2) ионная (электростатическое взаимодействие); 3) водородная связь (слабое электростатическое взаимодействие); 4) гидрофобные взаимодействия (Рис. 12).

Третичная структура завершает описание строения молекулы белка. Есть много белков, молекулы которых представляют собой комплексы, образованных из нескольких белковых молекул, соединенных нековалентными связями. Называют их олигомерными, мультимерными или субъединичными белками. Субъединица – отдельная полипептидная цепь, имеющая свою собственную третичную структуру. Укладку субъединиц в функционально активном белковом комплексе называют четвертичной структурой белка (Рис. 11d).

Белок с исходной, природной укладкой цепи называют **нативным**, а белок с развернутой, беспорядочной укладкой цепи – **денатурированным**.

Укладка цепи в нативные белки осуществляется в значительной мере благодаря слабым нековалентным связям, поскольку ковалентные связи при умеренном нагревании не разрываются. Сама полипептидная цепь в этих условиях остается интактной.

Денатурация белка – денатурацией называют существенные изменения вторичной и третичной структуры белка (Рис. 13), т.е. нарушение, разупорядочение нековалентных взаимодействий, *не затрагивающее его ковалентную структуру*. Денатурация, как правило, сопровождается инактивацией белка. Однако инактивация сама по себе не может служить критерием денатурации (конформационные переходы в белке не приводят к утрате упорядоченности в структуре белка). *Характерным признаком денатурации является именно утрата упорядоченности*. Переход от нативного состояния к денатурированному происходит резко и скачкообразно.

Факторы, вызывающие денатурацию белка. *Повышение температуры* приводит к возрастанию вклада энтропийного фактора (энтропия – определяется как степень неупорядоченности), что обуславливает тепловую денатурацию, происходящую, как

правило, скачкообразно. Температура денатурации белков весьма различна и существенно зависит от других условий.

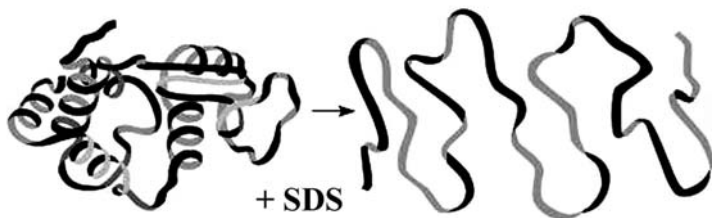


Рис. 13. Денатурация белка под действием додецилсульфата натрия

Воздействие на белок реагентов, нарушающих нековалентные взаимодействия, прежде всего систему водородных связей. Для стабильности структуры белка необходимо образование не менее 90% возможных водородных связей внутри белковой глобулы. Разрыв значительной их части вызовет переход нативной структуры в денатурированное состояние. К таким реагентам относятся концентрированные **растворы мочевины** (6-8 М), **солянокислого гуанидина** (6 М), **органические растворители** (спирты, формамид, муравьиная кислота) и **ионные детергенты** (анионный детергент - додецилсульфат натрия).

Молекула **мочевины** как бы имитирует пептидную связь и способна выступать и как донор и как акцептор водородных связей, конкурируя с пептидными и функциональными группами белка, образующими в нативной структуре внутримолекулярные водородные связи. Денатурация белка при увеличении содержания мочевины в растворе происходит скачкообразно. Действие высоких концентраций мочевины, кроме того, может быть связано и с нарушением структуры воды (за счет образования водородных связей с молекулами мочевины).

Ионные детергенты – додецилсульфат натрия в концентрации 0,5 мМ образует контакты с гидрофобными

остатками белка, что приводит к полному разворачиванию третичной структуры (Рис. 13). Взаимное отталкивание практически всегда отрицательно заряженных сульфатных групп влечет за собой вытягивание комплекса додецилсульфат–белок в палочковидную структуру. Такой способ денатурации нашел широкое применение при электрофоретических исследованиях белков в полиакриламидном геле для определения молекулярной массы полипептидных цепей. Форма комплекса додецилсульфат–белок определяется только длиной полипептидной цепи. Присутствие дисульфидных связей в белке не позволяет цепи развернуться в линейную структуру. В виду этого денатурацию ДДС-Na обычно дополняют восстановлением дисульфидных связей меркаптоэтанолом или дитиотреитолом.

Установить полноту денатурации, т.е. полное исчезновение системы нековалентных взаимодействий, свойственных нативной структуре, довольно трудно. Обычно ограничиваются тем, что наблюдают за изменением какого-либо одного физического параметра структуры белка. Полагают, что денатурация завершилась, если наблюдаемый параметр достигает предельного значения. Например, если спектр флуоресценции перестает изменяться, достигнув формы, характерной для белка, в котором все остатки триптофана и тирозина равно доступны растворителю.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

К наиболее широко применяемым методам определения концентрации белка относятся следующие: биуретовая реакция, метод Лоури, метод Гринберга, метод Бредфорда, измерение поглощения в ультрафиолетовой области спектра.

Биуретовая реакция

При добавлении к раствору белка сильнощелочного раствора меди появляется пурпурное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации белка (Скоупс, 1985). Развитие

окраски обусловлено наличием в белке пептидных связей, хотя бы двух. Для метода характерна низкая чувствительность, но он отличается высокой точностью. Измерение поглощения проводят при 540 и при 310 нм.

Мешающие соединения: пептиды, ТРИС, сахароза и желчные пигменты дают окраску в биуретовой реакции; соли аммония, ТРИС, сахароза и глицерин оказывают влияние на окраску, даваемую белками; липиды и детергенты могут вызвать помутнение.

Реагенты. Растворяют 1,5 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) и 6,0 г тартрата калия-натрия ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) в 500 мл воды. Добавляют 300 мл 10%-ной гидроокиси натрия (NaOH) и доводят объем водой до 1 л. Если к раствору добавить 1 г иодида калия, то реактив будет храниться в пластиковом сосуде в течение неопределенно долгого времени.

Ход определения. К 0,5 мл раствора белка неизвестной концентрации (до 3 мг) добавляют 2,5 мл реактива. Перед измерением оптической плотности при 540 нм раствор выдерживают 20 – 30 мин. Количество белка в образцах определяют при помощи калибровочной кривой. В качестве стандартного раствора используют БСА (выбирают диапазон концентраций от 1 до 10 мг).

Метод Лоури

Метод сочетает в себе биуретовую реакцию и реакцию Фолина (на тирозин и триптофан), при этом белки, их содержащие, дают интенсивную темно-синюю окраску (Lowry et al., 1951). Метод отличается высокой чувствительностью, так как дает хорошую окраску с белками, концентрация которых составляет 0,1 мг/мл и ниже.

Вещества, которые не мешают определению белка по методу Лоури (в конечной концентрации): мочевины (0,5%),

гуанидин (0,5%), вольфрамат натрия (0,5%), сульфат натрия (1%), хлорная кислота нейтрализованная (0,5%), трихлоруксусная кислота нейтрализованная (0,5%), этиловый спирт (5%), эфир (5%), ацетон (0,5%), сульфат цинка (0,1%), гидроокись бария (0,5%), сульфат аммония (0,15%).

Мешает определению 0,04 М фосфатный буфер. В присутствии 0,1 М наблюдается образование осадка. Глицин в концентрации 0,5% уменьшает интенсивность окраски на 50%. Заниженные количества белка определяются при наличии в среде 0,37-3,65 mM трис-буфера (концентрации ниже 0.15 mM влияния не оказывают). Подобного эффекта можно избежать, если при построении калибровочной кривой добавить трис-буфер в той же концентрации, которая содержится в исследуемом образце.

Реагенты.

Раствор А - 2%Na₂CO₃, растворенный в 0,1N NaOH.

Раствор В - готовят заранее, работают 1% CuSO₄*5H₂O и 2% тартрат KNa. Затем их сливают одновременно в одну ёмкость. Оставляют до образования осадка (хранят в тёмном месте до полугода).

Раствор С – смешивают 50 мл раствора А с 1 мл раствора В. Раствор готовят ежедневно.

Раствор D – коммерческий реактив Фолина – Чокальтеу, предварительно разведенный бидистиллированной водой в соотношении 1:1. Раствор готовят ежедневно.

Ход определения. Отбирают 10 мкл митохондриальной суспензии. Помещают в пластиковые пробирки, где пробу растворяют в 2 мл 0,2 N раствора NaOH в течение 30-60 минут. Пробу необходимо тщательно перемешать для предотвращения прилипания белка к стенкам пробирки. Из каждой пробы в стеклянные пробирки отбирают определенное количество растворенного белка (0,2 мл пробы + 0,2 мл бидистиллированной

воды или 0,4 мл пробы) в трёхкратной повторности. Контролем служит пробирка с 0,4 мл бидистиллированной воды. В каждую пробирку приливают по 2 мл **раствора С**. Тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут. Через 10 минут добавляют по 0,2 мл **раствора D**, тщательно перемешивают и оставляют в темноте на 30 минут для развития окраски.

По истечению указанного времени у исследуемых образцов определяют оптическую плотность на спектрофотометре при следующих условиях: длина волны 750 нм, чувствительность 10. Вычисляют среднее значение оптической плотности для каждой пробы. Количество белка в образцах определяют при помощи калибровочной кривой. В качестве стандартного раствора используют БСА (выбирают диапазон концентраций от 10 до 100 мкг).

Метод Бредфорда

Основан на адсорбции красителя Кумасси ярко синий G-250. При связывании красителя с белком развивается ярко-синяя окраска (Bradford, 1976). Поглощение измеряют при 595 нм.

Мешающие соединения: сильнощелочные буферы, детергенты SDS.

Реагенты. Кумасси G-250 (100 мг) растворяют в 50 мл 95%-ного этанола. Добавляют 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Разбавляют водой до 1 л.

Ход определения.

А) К 0,1 мл раствора белка (концентрация 10-100 мкг в 0,1 мл) добавляют 5 мл реагента и перемешивают. Не ранее, чем через 5 мин и не позднее, чем через 1 ч измеряют поглощение при 595 нм относительно чистого реагента.

Б) К 0,1 мл раствора белка (концентрация 1-10 мкг в 0,1 мл) добавляют 1 мл реагента и перемешивают. Не ранее, чем через 5

мин и не позднее, чем через 1 ч измеряют поглощение при 595 нм относительно чистого реагента.

Количество белка в образцах определяют при помощи калибровочной кривой.

Метод Гринберга

Метод Гринберга и Крэддока основан на адсорбции красителя бромфеноловый синий (Greenberg, Craddock, 1982).

Реагенты. 50 мг бромфенолового синего (Реанал, Венгрия) растворяют в 40 мл 95% этанола. Реактив фильтруют, добавляют 6 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл Тритона X-100. Объем доводят до 500 мл бидистиллированной водой.

Ход определения. К 0,1 мл белка добавляют 0,9 мл реагента. Через 10 мин после добавления реагента определяют поглощение при длине волны 610 нм. Калибровку проводят по бычьему сывороточному альбумину (БСА) в разведениях от 0,1 до 1,0 мг в 1 мл раствора. Раствор БСА готовят на буфере для экстракции белков. Повторность калибровки и определения белка 3-х кратная.

Измерение поглощения в УФ-области спектра

Метод основан на способности ароматических аминокислот (тирозин и триптофан) поглощать УФ-излучение при 280 нм. Измеряя величину оптической плотности, судят о количестве присутствующего в растворе белка (Скоупс, 1985). Поглощение при 280 нм дает лишь приблизительное представление об истинном содержании белка.

Мешающие соединения: нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, имеющие пик поглощения при 260 нм.

2.1 ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО БЕЛКА

Оборудование, материалы, реактивы. Работу по выделению и очистке белков проводят в холодной комнате или специальном криостате при температуре $0 - 4^{\circ}\text{C}$ (Рис. 4). Из оборудования основными являются: центрифуги с охлаждением до 0°C и ниже, применяемые для отделения осадков; гомогенизаторы для разрушения клеток, спектрофотометр, служащий для измерения концентрации белков и активности ферментов, а также обычное лабораторное оборудование: весы, рН-метры, мешалки, градуированные цилиндры, пипетки и микропипетки, аппараты для приготовления льда или жидкий азот. Из реактивов необходимы различные буферные растворы, сульфат аммония, реактив Фолина-Чокальтеу, органические растворители и т.д. Жидкие химические реактивы должны быть перегнаны, сухие – перекристаллизованы. В работе желательно применять бидистиллированную воду.

Исходный материал. В основном белок выделяют из этиолированных побегов проростков растений. Чем быстрее используется сырье, тем лучше, поскольку препарат получается более соответствующий физиологическому состоянию. В случае необходимости хранения, как сырье, так и экстракты из него необходимо хранить в замороженном виде в кельвинаторе или жидком азоте. Чем выше скорости замораживания и оттаивания, тем лучше.

Разрушение клеток и экстракция. Растительные клетки разрушаются труднее, чем клетки животных, из-за наличия у них целлюлозной оболочки. При их разрушении применяют следующие методы: механическое разрушение крупных клеток и отделение друг от друга мелких с помощью лопастного гомогенизатора; растирание в ступке с абразивом (происходит разрушение клеточных стенок за счет шероховатостей на ступке и пестике); использование пресса Френча (клетки продавливаются через маленькие отверстия под давлением).

После разрушения клеток и осаждения нерастворимого материала центрифугированием получают «экстракт». Смесь до центрифугирования называют гомегенатом. При получении экстракта потери за счет удерживания жидкости осадком не должны составлять более 20%. При разрушении растительных клеток высвобождается большое количество жидкости, что казалось бы, не требует добавления экстрагирующего раствора. Тем не менее использование экстрагирующего раствора необходимо для контролирования нежелательных процессов, происходящих во время гомогенизации: подкисления среды или окисления нестойких соединений, которые под действием фенолоксидаз окисляются с образованием темных пигментов и ковалентно соединяются с белками. В связи с этим экстрагирующий раствор должен обладать буферной емкостью (ионная сила – 0,1-0,2 М – и рН 7-7,5 должны быть близки к физиологическим) и содержать тиоловые соединения (дитиотриетол, β - меркаптоэтанол) и ингибиторы протеаз (ФМСФ - фенилметилсульфонилфлюорид) для предотвращения протеолиза белков в ходе выделения.

Осаждение белков. Добавление к водному экстракту, содержащему белки, таких растворителей, как этанол, ацетон, метанол, н-пропанол, диоксан и др., вызывает осаждение белка вследствие снижения активности воды. По мере возрастания концентрации органических растворителей снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул белка. Молекулы белка, расположенные вокруг гидрофильных участков на поверхности белка, могут быть замещены молекулами органического растворителя. Суммарное действие органического растворителя на белки состоит в снижении их растворимости до уровня, при котором начинается агрегация и осаждение. Установлено, что вблизи изоэлектрической точки белков осаждение происходит при более низкой концентрации растворителя. На осаждение влияет размер молекулы: крупные агрегируют быстрее, чем мелкие. Наиболее широко используются в качестве

растворителя этанол и ацетон. Ацетон обладает хорошим осаждающим эффектом, не реагирует с белками, летуч и по сравнению с этанолом проявляет более слабое денатурирующее действие. Большинство белков осаждаются при добавлении ацетона до концентрации 20 – 50% (v/v). Осаждение ацетоном необходимо проводить при температуре около 0 °С, поскольку при температурах выше 10 °С становится заметным его денатурирующее действие.

Ход выделения. Срезанные побеги растирают в ступке с жидким азотом или разрушают прессом Френча и белок экстрагируют 0.1 М Трис-НСl буфером (рН 7.6), содержащим 0.01 М β-меркаптоэтанол и 1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид (ФМСФ). Гомогенат центрифугируют 20 мин при 15000 об/мин, осадок отбрасывают, а белки из супернатанта осаждают охлажденным ацетоном в соотношении 1:2 (одна часть супернатанта на две части ацетона). После осаждения белков ацетон отсасывают пипеткой, а осадок центрифугируют при 10000g в течение 10 мин. Ацетон сливают, осадок растворяют в 0,0625 М Трис-НСl- буфере (рН 6.8). В белковых образцах определяют содержание белка любым из описанных выше методов.

2.2 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ С ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ (ПААГ с ДДС-NA) (ДЕНАТУРИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ)

Принцип метода. Белки денатурируют анионным детергентом - додецилсульфатом натрия. Электрофорез в ПААГе с ДДС-На обладает высокой разрешающей способностью и позволяет фракционировать белки в зависимости от их молекулярной массы (Остерман, 1985; Скоупс, 1985) (Рис. 14). Обработка додецилсульфатом натрия обеспечивает денатурацию белка и

разрыв -S-S- связей, но для полной денатурации необходимо присутствие β -меркаптоэтанола. Додецилсульфат натрия сильно связывается с белками за счет гидрофобных взаимодействий, так что достаточно только 0,1%-ного раствора этого детергента, чтобы насытить им полипептидные цепи. При этом связывается приблизительно 1 молекула детергента на 2 аминокислотных остатка. Хотя в данной системе невозможно разделить белки одинаковых размеров, тем не менее, этот метод дает наивысшее разрешение и самые четкие зоны по сравнению с любым другим методом. С помощью смеси стандартных полипептидов известной молекулярной массы гель можно прокалибровать в отношении зависимости подвижности молекул от их размеров.

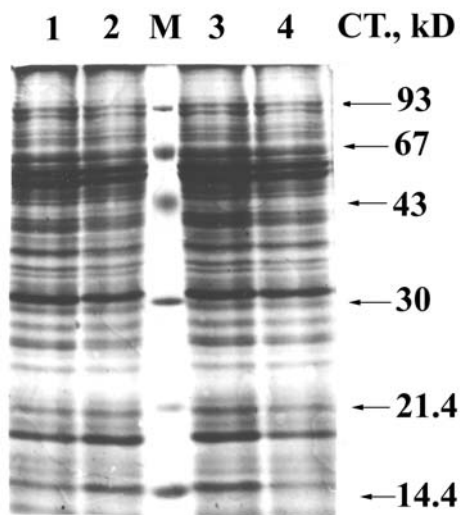


Рис. 14. Разделение белка в ПААГ по Лэммли. М-маркеры, 1 – 4 – анализируемые белки.

Система электрофореза с ДДС-На была разработана Лэммли (Laemmli, 1970). Рабочий гель полимеризуют на длину 10 см,

формирующий на 1 см. Особенностью ступенчатого электрофореза является полимеризация в одной пластине двух гелей: рабочего – мелкопористого и непосредственно над ним формирующего – крупнопористого. Кроме степени пористости эти гели резко различаются по pH и молярности буферов, в которых они полимеризуются. В формирующем геле небольшой протяженности (1-3 см) фракционирования белков не происходит. Основное назначение этого геля состоит в том, чтобы собрать смесь белков перед переходом в рабочий гель в одну узкую полосу. Для рабочего геля она является исходной зоной для фракционирования, а это резко повышает его разрешающую способность. Важнейшее преимущество гелей – это их стабилизирующее действие, проявляющееся в снижении до минимума конвекционной и диффузионной подвижности белков. Поэтому белковая полоса остается узкой все время, пока белок движется через гель, и это приводит к тому, что достигается полное разделение белков с очень близкой подвижностью.

Крупнопористый формирующий гель полимеризуют в 0,0625 М трис-HCl, pH 6,8. Рабочий гель полимеризуют в 0,0375 М трис-HCl, pH 8,8. Полимеризацию инициируют, добавляя к раствору свежеприготовленный персульфат аммония, вместе с веществом, захватывающим свободные радикалы; для этого обычно используют TEMED (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин).

Персульфат аммония в водном растворе разлагается, поэтому его используют только свежеприготовленным. При приготовлении гелей он добавляется в последнюю очередь, поскольку является инициатором процесса полимеризации. Гомолитический разрыв связи между атомами кислорода в молекуле персульфата приводит к образованию достаточно долго живущих свободных радикалов с одним неспаренным электроном у атома кислорода. Такой радикал стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней таким образом, что снова образуется радикал с неспаренным электроном, но у атома С.

Этот радикал вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с образованием нового радикала и т.д. Цепная реакция полимеризация идет до тех пор, пока два радикала, встретившись между собой не образуют обычную ковалентную связь.

ТЕМЭД – захватывая свободные радикалы, служит катализатором реакции полимеризации и ускоряет его протекание.

Процессы, протекающие после включения электрического напряжения. В первый момент напряженность поля будет примерно одинаковой во всех зонах геля и начнется переход белков из буфера препарата в формирующий гель. В это же время в верхней части формирующего геля начнет развиваться новая ситуация. Под действием поля ионы Cl^- будут быстро уходить в направлении рабочего геля, а на их место из электродного буфера будут поступать ионы глицина, но здесь они окажутся в буфере с рН 6,8. При этом, большинство молекул глицина восстановит заряд своих аминогрупп, нейтрализуется и перестанет участвовать в проведении тока. Соппротивление буфера препарата, а затем и верхней части формирующего геля резко возрастет. Вместе с тем возрастет и напряженность поля. Немногочисленные при рН 6,8 заряженные молекулы глицина ускорят свое движение к аноду, обеспечивая непрерывность электрического тока по всему гелю. Идет переход белков из буфера препарата в формирующий гель. Ионы Cl^- , отступая, очищают весь объем этого геля. Вплотную за ними к границе с рабочим гелем подходит глицин. Концентрация белков в формирующем геле не происходит. Впереди идущие молекулы белков достигают границы раздела и переходят в рабочий гель, где попадают в область с низкой напряженностью поля. Скорость их падает. Между тем следующие за ними молекулы белка еще движутся в формирующем геле, причем с высокой скоростью, они входят в рабочий гель и почти останавливаются, догоняют впереди идущие белки. Весь препарат стягивается в узкую полоску. Отсюда и начинается их фракционирование. Чем

меньше объем наносимого белкового препарата, тем уже будут зоны. Желательно наносить белковую смесь на гель в минимальном объеме, чтобы высота их слоя была не более 2-3 мм.

Электрофорез по Лэммли. Электрофорез проводят в блоках полиакриламидного геля размером 70x80x1 мм в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970), используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell фирмы BIO-RAD (США) (Рис. 15).

Стеклянные пластины, одна из которых несколько длиннее другой (83x102 и 73x102 мм), отделяют друг от друга с помощью прокладок из органического стекла толщиной 1 мм и вставляют в устройство для заливки геля, прилагаемое к прибору для электрофореза Mini-PROTEAN II. В просвет между стеклянными пластинами заливают раствор мелкопористого полиакриламидного геля, а затем после его полимеризации, заливали крупнопористый гель. В последний погружают зубчатый шаблон из 1мм оргстекла для формирования карманов для нанесения белковых проб.

Верхним и нижним электродными буферами служит трис-глицин, pH 8.3 (25 mM Трис-HCl и 192 mM глицин), содержащий 0.1% ДДС-Na. Рабочий гель полимеризуют в 0,0375 M Трис-HCl буфере, pH 8.8, содержащем 0.1% ДДС-Na, а формирующий гель в 0,0625 M Трис-HCl буфере, pH 6.8, содержащем 0.1% ДДС-Na. Разделяющий гель имеет концентрацию 10-12.5% полиакриламида.

Первые полчаса, когда образцы входят в гель, устанавливают силу тока 50 мА на блок. Далее электрофорез проводят при постоянной силе тока 80 мА три часа, пока свидетель (бромфеноловый синий) не доходит до конца гелевого блока. После окончания электрофореза стеклянные пластины вынимают из прибора и освободившийся гель помещают в камеру для окрашивания или используют для переноса на нитроцеллюлозную мембрану.

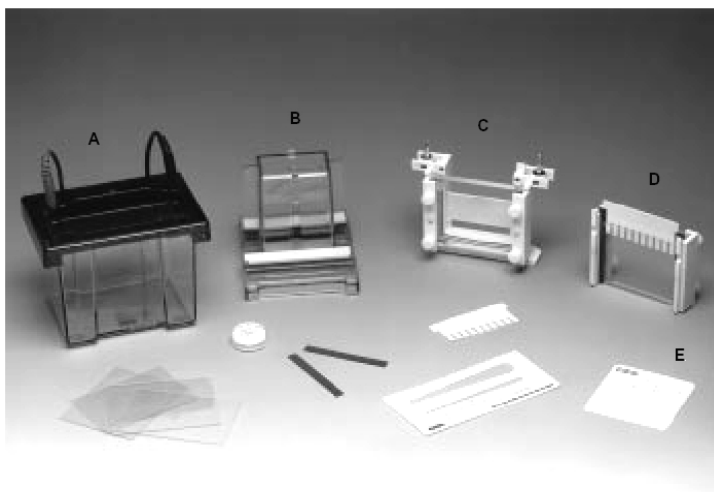


Рис. 15. Прибор для электрофореза Mini-PROTEAN II А – корпус, В – устройство для заливки геля, С – внутренний корпус, D – гель между стеклами со вставленной гребенкой, Е – спэйсер.

Окраска и обесцвечивание гелей. После окончания электрофореза гели окрашивали в водном растворе, содержащем 0.1% Кумасси R-250 (“Sigma”, США), 25% изопропанол, 10% уксусную кислоту. Для обесцвечивания фона гели переносили в раствор, содержащий 10% уксусную кислоту и 15% изопропанол и отмывают в течение нескольких часов.

Определение молекулярных масс полипептидов. Определение молекулярных масс полипептидов проводят, используя в качестве стандартов набор белков (“Pharmacia”, Швеция). После окрашивания гели сканируют, и молекулярные массы исследуемых полипептидов определяют по калибровочной кривой, которую строят для каждого геля по методике, прилагаемой к набору, при помощи программы “Sigmagel”.

2.3 Электрофорез в ПААГ нативного белка в градиенте пористости геля

Электрофорез проводят в блоках полиакриламидного геля размером 110x100x1 мм (Anderson et al., 1972) (Рис. 16).

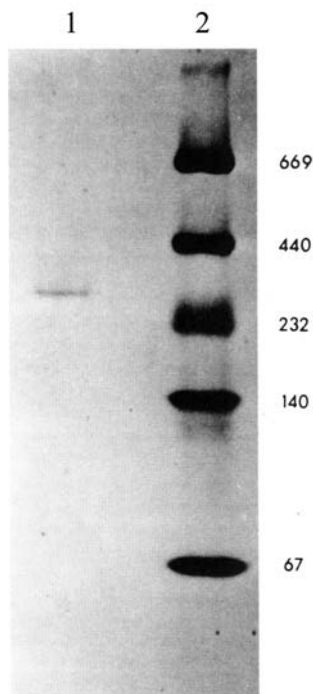


Рис. 16. Электрофорез нативного белка в градиенте пористости ПААГ. 1-анализируемый белок, 2- маркеры

Стеклянные пластины, одна из которых несколько длиннее другой (130x150 и 130x130 мм), отделяют друг от друга с помощью прокладок из органического стекла толщиной 1 мм и склеивают липкой лентой. В просвет между стеклянными пластинами заливают раствор мелкопористого полиакриламидного геля, а затем, после его полимеризации, заливают крупнопористый гель. В

последний погружают зубчатый шаблон из 1мм оргстекла для формирования восьми карманов для нанесения белковых проб.

Верхним электродным буфером служит трис-глицин, рН 8,3 (0,025 М Трис и 0,192 М глицин). Нижний электродный буфер имеет такой же состав. Рабочий гель полимеризуют в 0,375 М Трис-НCl буфере, рН 8,8, а формирующий гель в 0,0625 М Трис-НCl буфере, рН 6,8. Анализируемые белки растворяют в буфере, который содержит: Трис-НCl (0,0625 М, рН 6,8), 2-меркаптоэтанол 5%, глицерин 10%, бромфеноловый синий 0,001%. Электрофорез проводят, выравнивая объем наносимого белкового препарата по количеству наносимого белка, не допуская в то же время перегрузки по белку, т.е. не более 25-30 мкг белка на трек.

Разделяющий гель содержит градиент концентрации от 4.5 до 20 % полиакриламида. Этот градиент создают с помощью трех каналов перистальтического насоса Р-3 (Pharmacia, Швеция). Для того чтобы полимеризация проходила равномерно, полимеризующиеся блоки охлаждают. Для создания ровной верхней границы разделяющего геля на него наслаивают изобутанол, насыщенный водой. Электрофорез проводят в охлаждаемой камере. Стекланные блоки прижимают специальными зажимами к передней части катодного отсека так, чтобы меньшая пластина была на уровне выреза в передней стенке прибора, а большая пластина была выше этого выреза. После заливки сочленений 1,5% агарозой в электродный резервуар наливают верхний электродный буфер. Пластины опускают в нижний электродный буфер. Для того чтобы между прокладками и пластинами не протекал электрический ток, эти стыки проливают расплавленным парафином. Охлаждение гелевых блоков осуществляют, пропуская холодную воду через трубчатый холодильник, встроенный в анодную часть. Этот холодильник охлаждает нижний электродный буфер, в который были опущены стекланные блоки.

В карманы геля накладывают по 20-25 мкл белкового образца. Первые полчаса, когда образцы входят в гель, устанавливают силу тока 10 мА на блок. Далее электрофорез проводят при постоянной силе тока 20 мА. Электрофорез проводят сорок восемь часов, пока свидетель (бромфеноловый синий) не доходит до конца гелевого блока. После окончания электрофореза стеклянные пластины вынимают из прибора, освобождают гель и помещают его в камеру для окрашивания.

2.4 Электрофорез в ПААГ нативного белка со сдвигом заряда

Электрофорез проводят в разработанной нами системе в блоках 7.5% полиакриламидного геля размером 70x80x1 мм, используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell фирмы BIO-RAD (США). Анализируемые белки растворяют в Трис-НСl буфере (0,0625 М, рН 6,8), содержащем 2-меркаптоэтанол (5%), глицерин (10%), бромфеноловый синий (0,001%). Верхним электродным буфером служит трис-глицин, рН 8,3 (0,025 М Трис и 0,192 М глицин). Для обеспечения сдвига заряда белков ("charge shift"), в отличие от недавно предложенной системы, известной под названием «синего нативного электрофореза», в которой для этой цели используется краситель «Кумасси ярко-синий» (Jansch et al., 1996; Kugler et al., 1997), в разработанной нами системе в верхний электродный буфер добавляется SDS (0.01%) (Колесниченко и др., 2000). Нижний электродный буфер имеет такой же состав. Рабочий гель полимеризуют в 0,375 М Трис-НСl буфере, рН 8,8, а формирующий гель в 0,0625 М Трис-НСl буфере, рН 6,8.

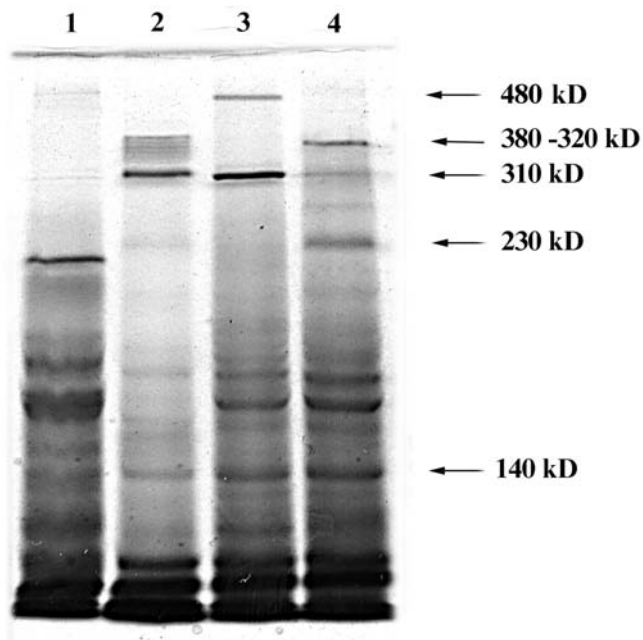


Рис. 17. Электрофорез в ПААГ нативного белка со сдвигом заряда.

Треки: 1- кукуруза, 2 – элимус, 3- рожь, 4- пшеница.

Белки визуализируют окрашиванием Кумасси R-250. После окрашивания гели сканируют и определяют относительные молекулярные массы белков при помощи программы “Sigmagel”. Как показал опыт применения данной системы (Голицын, 1999; Kolesnichenko et al., 1999), состав белков и определенные при ее помощи их молекулярные массы в диапазоне от 100 до 700 кД совпадают с составом белков и их молекулярными массами, определенными при помощи электрофореза нативных белков в градиенте полиакриламидного геля по Андерсон, Борг и Микаэльсон (Anderson et al., 1972). В то же время применение данной системы позволяет, за счет отсутствия сложного и

длительного этапа заливки геля с градиентом концентрации полиакриламида, значительно ускорить и упростить проведение электрофореза.

2.5 Блоттинг

Блоттинг – прием, заключающийся в переносе разделенных соединений из толщины геля на плоский носитель (ацетат целлюлозы, нитроцеллюлозу, бумагу, капрон, стеклянный фильтр). Различают следующие виды блоттинга: 1) диффузионный (при наложении пленки с анализируемым ингредиентом он переходит на подложку в силу простой диффузии); 2) вакуумный (переносу помогает отрицательное давление, создаваемое под подложкой); 3) электрофоретический (образуется наложением тока перпендикулярно поверхности подложки). В настоящее время в основном используют электрофоретический блоттинг, соответствии с которым, гель, содержащий разделенные компоненты образца приводят в соприкосновение с мембраной, а затем прокладывают слоями фильтровальной бумаги.

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг включает в себя иммобилизацию белков на нитроцеллюлозной мембране с последующим выявлением анализируемых белков на полученной реплике при помощи специфических антител и иммуноферментного анализа. Иммуноблоттинг белков подразделяется на Dot-Blotting, когда на мембране в одном пятне иммобилизуется белковая смесь, и Western-Blotting, при котором белки сначала разделяются при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. В данном случае, разрешающая способность электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) усиливается путем выборочного связывания антител или специфических реагентов - лигандов с компонентами белковой смеси, иммобилизованными на мембране. Разделение белковых полос, полученных во время электрофореза, сохраняется при

переносе на мембрану и не подвергается диффузии во время последующей обработки. Преимуществами иммуноблоттинга являются высокая чувствительность метода, относительно небольшое время и достаточно несложная техника проведения анализа. Иммуноблоттинг белков в настоящее время получил весьма широкое распространение (Bers, Garfin, 1985).

Процесс иммуноблоттинга состоит из пяти шагов:

1. Иммобилизация белков на нитроцеллюлозной мембране при помощи электрофоретического переноса белка из геля или прямого нанесения белковой смеси на мембрану;
2. Блокирование незанятых на мембране мест с целью предотвращения неспецифического связывания на мембране антител;
3. Обработка мембраны в растворе первичных антител с целью выявления интересующих белков;
4. Обработка мембраны в растворе вторичных антител, специфических по отношению к первичным антителам, с пришитыми к ним индикаторами, то есть ферментами или частицами коллоидного золота;
5. Визуализации белковых полос при помощи культивирования с соответствующими субстратами, образующими нерастворимые окрашенные продукты реакции. В случае использования вторичных антител с пришитым к ним коллоидным золотом, белковые полосы становятся видимыми без этого последнего шага.

Первоначальным шагом в любом эксперименте блоттинга является иммобилизация белков на мембране. Наиболее популярные методы блоттинга используют для переноса белков из геля на мембрану электрофоретический перенос. Он является быстрым и эффективным методом, а также сохраняет высокое разрешение, полученное при электрофорезе в полиакриламидном

геле. Имеются два основных типов аппаратов для электроблоттинга - "мокрый" и "полусухой".

При "мокром" блоттинге перенос проводится в пластмассовой емкости с буфером. "Сэндвич" из прокладок, геля и мембраны помещается вертикально между платиновыми электродами в емкости с буфером Towbin (25 mM Трис, 193 mM глицин, 20% метанол, 0.05 - 0.1% ДДС-Na, pH 8.3). Данная система позволяет проводить быстрый и эффективный перенос белков на мембрану, но требует обязательного охлаждения буфера.

При "полусухом" блоттинге пористые прокладки, гель и мембрана расположены между двумя горизонтально расположенными электродами. Полусухой блоттинг требует значительно меньшего объема буфера, чем "мокрый", поскольку резервуарами ионов во время переноса служат пористые прокладки.

Выбор мембран определяется особенностями применяемой техники переноса белков, однако в настоящее время наибольшее распространение получили мембраны из нитроцеллюлозы.

Буфер для переноса должен обеспечить эффективное вымывание белков из матрицы геля и связывание их с мембраной. Поскольку оптимальные условия для переноса различных белков отличаются, имеются несколько систем буферов, пригодных для данной цели. Наиболее часто применяется буферная система, впервые описанная Towbin с соавт. (25 mM Трис, 193 mM глицин, 20% метанол, 0.05 - 0.1% ДДС-Na, pH 8.3). Для переноса большинства белков в этом буфере достаточно проводить процесс при напряжении 7.5 В/см и токе от 200 до 800 мА в течении 3 часов. Добавление в буфер для переноса метанола позволяет предотвратить разбухание геля, а также способствует извлечению SDS из комплекса с белками и обеспечивает их ренатурацию. В то же время, поскольку белки плохо переносятся вблизи их изоэлектрической точки, для переноса используются и другие буферные растворы: по Davis с соавт. (20 mM трис -ацетат, 2 mM

ЭДТА, 0.01% ДДС-Na, pH 7.5); по Gershoni с соавт.(41 mM трис, 40 mM борат, pH 8.3); по Reiser с соавт (10 mM Na-борат, pH 9.2); по Huang с соавт (25 mM фосфат, pH 6.5) и ряд других буферных систем.

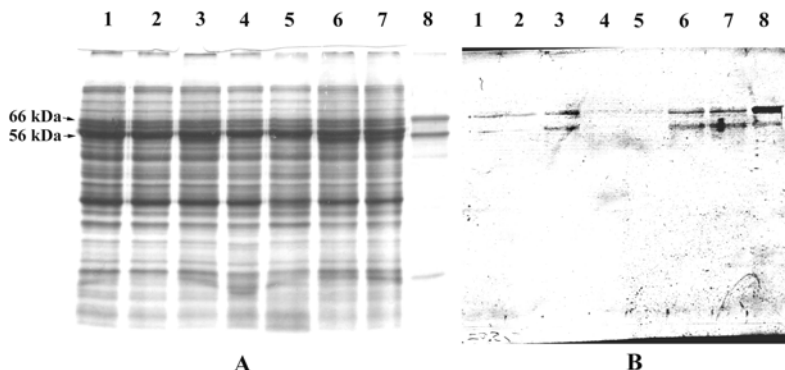


Рис. 18. Денатурирующий электрофорез в ПААГ (А) и иммуноблоттинг (В) белков с первичными антителами против стрессового белка.

Поскольку элюция ряда высокомолекулярных белков, а также плохо растворимых мембранных белков из геля после ДДС-Na -электрофореза часто оказывается затруднена из-за их преципитации в геле под действием метанола, для улучшения переноса используют два приема: либо из состава буфера для переноса исключается метанол, либо в буфер вводится ДДС-Na или другие детергенты. Исключение из буфера метанола позволяет улучшить перенос, но в то же время ухудшает связывание белков с нитроцеллюлозной мембраной. Введение же в буфер ДДС-Na ухудшает связывание белков с нитроцеллюлозной мембраной и увеличивает электропроводность буфера, что вызывает увеличение силы тока и тепловыделения в процессе переноса. В то же время ДДС-Na не оказывает влияния на связывание белков с PVDF-мембранами и положительно заряженными мембранами из нейлона.

Выбор электрических параметров переноса определяется необходимостью достижения наивысшего напряжения поля при наименьшей силе тока, что связано с необходимостью минимизации выделения тепла в процессе переноса.

Выявление анализируемых белков на полученной реплике при помощи специфических антител и иммуноферментного анализа обычно включает в себя следующие шаги:

- 1) Блокирование оставшихся несвязанными с белками после переноса центров связывания на мембране;
- 2) Инкубирование с первичными антителами;
- 3) Отмывку;
- 4) Инкубирование с вторичными антителами с пришитыми к ним ферментами или лигандами;
- 5) Отмывку;
- 6) Проявление при помощи добавления субстрата и развития цветной реакции.

Блокирование мембраны проводится с целью предотвращения неспецифического связывания первичных антител. В случае недостаточной блокировки мембраны возможно появление высокого уровня фона на дальнейших ступенях обработки. Для блокировки нитроцеллюлозных мембран используются различные реагенты, в том числе 3% желатин, 5% обезжиренное сухое молоко, 1% БСА и Tween-20. Для блокировки положительно заряженных нейлоновых мембран обычно используется обезжиренное сухое молоко.

При проведении иммуноблоттинга возможны осложнения, связанные с фоновыми явлениями трех типов:

- 1) Фоновое окрашивание всей поверхности мембраны. Оно может происходить как при недостаточном блокировании центров сорбции, так и вследствие слишком высокой концентрации используемых вторичных антител либо отсутствия мягкого

детергента на этапах отмывки.

2) Неспецифическое окрашивание отдельных зон может происходить за счет примесей в растворе первичных антител или перекрестной иммунной активности используемого препарата первичных антител, а также при слишком высокой концентрации в растворе первичных антител.

3) Окрашивания белковых полос за счет прямого взаимодействия исследуемых белков с вторичными антителами без посредничества первичных антител при нанесении на мембрану избыточных количеств исследуемых белков, либо за счет прямой реакции исследуемых белков с используемым субстратом.

Первичные антитела могут использоваться как поликлональные, так и моноклональные. Поликлональные антитела используют в разведении 1:1000 - 1:10 000. Моноклональные антитела используются в разведении от 1:100 до 1:1000, что объясняется тем, что они в каждом случае специфичны лишь к одной определенной детерминанте нативного белка, которая с определенной вероятностью может необратимо разрушаться в денатурирующих условиях SDS-электрофореза.

Вторичные антитела служат для выявления первичных антител, преципитировавших на специфичных для них белковых зонах. Вторичные антитела могут быть конъюгированы как с ферментами для последующего иммуноферментного анализа, так и с люминесцентными зондами или частицами коллоидного золота для непосредственной их визуализации.

Наиболее широко распространенными ферментами, используемыми для конъюгации со вторичными антителами, являются пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза. Пероксидаза хрена - первый фермент, использованный для иммунологического выявления при иммуноблоттинге. Преимуществами данной системы является относительная дешевизна как ферментного конъюгата, так и субстратов, используемых для развития окраски. В то же время чувствительность данной системы ниже, чем у других, используемых в настоящее время систем. К тому же окрашенные

продукты реакции обесцвечиваются под действием света. Еще одним недостатком пероксидазной системы является то, что азид натрия, широко используемый для консервации растворов и сывороток, является ингибитором действия фермента.

Система щелочной фосфатазы имеет более высокую чувствительность. Растворимые субстраты системы, BCIP и NBT, образуют более прочные продукты реакции, не обесцвечивающиеся под действием света.

Для увеличения чувствительности при иммуноблоттинге используются системы с биотинилированными вторичными антителами. Данный метод использует средство биотина и авидина. Поскольку стрептавидин связывает несколько молекул биотина, связывание фермента с интересующими белковыми зонами усиливается. Другое преимущество данной системы - способность обнаруживать белки, связанные с положительно заряженной нейлоновой мембраной. Данная система обладает в 10 - 50 раз более высокой чувствительностью, а также не требует наличия метанола в буфере для переноса.

Альтернативой для систем проявления, использующих цветные продукты реакции, может служить система щелочной фосфатазы с хемолуменисцирующим субстратом, засвечивающим высокочувствительную фотопленку (Voyta et al., 1988). Данная система обладает очень высокой чувствительностью, позволяющей обнаруживать пикограммовые количества белка в менее чем за 15 минут. При этом она оптимизирована для получения очень низкого фона при использовании нейлоновой мембраны при стандартной процедуре переноса и блокировании мембраны обезжиренным сухим молоком.

Альтернативой для систем обнаружения, использующих энзим - субстратные методы, является использование вторичных антител с пришитыми к ним частицами коллоидного золота (Brada, Roth, 1984; Surek, Latsko, 1984; Hsu, 1984; Moeremans et al., 1984).

Частицы золота прочно конъюгированные с вторичными антителами, белком А или белком G, связываются в комплексы антитело антиген и фиксируют розовое окрашивание золотых частиц на поверхности мембраны. Использование системы коллоидного золота позволяет избежать многих проблем, связанных с использованием окрашивающих субстратов, в том числе нестабильности результатов окрашивания в результате неспецифических реакций и необходимости отказа от консервации сывороток азидом натрия.

Еще одно преимущество системы коллоидного золота в том, что чувствительность метода может быть повышена путем обработки серебром, адсорбирующимся на связанных с мембраной - золотых частицах. Розовые полосы, таким образом, превращаются в черные, повышая чувствительность обнаружения в пикограммовой области.

2.6 *Ход проведения электрофореза.*

1. Собирают прибор: большая стеклянная пластинка, по краям прокладки, посередине картонку, маленькая стеклянная пластинка. Стеклянные пластинки должны быть хорошо промытыми, чистыми (протирают ватой, смоченной спиртом). Стекла уравнивают по высоте, прикручивают гайками, сначала не до конца, затем полностью. Картонку вынимают. Таким образом готовят две пластины для геля.

2. Готовят разделяющий гель (предварительно проверяют буфер В (рН 8,8)). На две пластинки нужно 15 мл. Например, для приготовления 12,5% полиакриламидного геля нужно взять:

	Компоненты	Объем, мл
1	H ₂ O	4,75
2	А (акриламид)	6,25
3	В (рН 8,8)	3,75
4	Д (ДДС-Na)	0,15
5	ТЕМЭД	10 мкл
6	Е (персульфат)	0,15

Все компоненты добавляют в строгой последовательности. Растворяют персульфат.

3. Заливают разделяющий гель между стеклянными пластинками до определенной высоты. Для создания ровной верхней границы сверху наслаивают изобутанол, насыщенный водой. Изобутанол наносят микропипеткой. При комнатной температуре гель полимеризуется в течение 30 мин.

4. Готовят концентрирующий гель (предварительно проверяют буфер С (рН 6,8). Состав буфера представлен в списке буферов.

5. Полимеризующий гель промывают дистиллированной водой (10 раз), обсушивают фильтровальной бумагой, заливают концентрирующий гель и вставляют зубчатый шаблон (гребенка). Следят, чтобы не было воздуха. Полимеризуют 30 мин. Вынимают шаблон, гель промывают дистиллированной водой (10 раз), обсушивают фильтровальной бумагой.

6. Вставляют пластины с гелями в блок (маленькое стекло внутрь) и в резервуар, наполненный нижним электродным буфером. Кармашки заполняют пробамми белков. Осторожно микропипеткой заполняют кармашки верхним электродным буфером, чтобы не выплескивались белки, лишнее удаляют фильтровальной бумагой. В блок заливают верхний электродный буфер.

7. Закрывают крышкой с электродами и подключают. Вначале устанавливают низкое напряжение (50V), чтобы проникновение белка в гель шло медленнее. Затем переключают на 100V и оставляют на 3 ч. Следят за поведением красителя бромфенолового синего, как только он достигнет нижней границы геля, снижают напряжение до нуля, отключают прибор. Блок с гелями вынимают, верхний электродный буфер сливают в банку (смешивать с нижним буфером нельзя), снимают стеклянную пластинку, обрезают кармашки скальпелем.

8. Гель помещают в емкость для окрашивания, окрашивают в течение 30-60 мин (если свежий краситель), промывают дистиллированной водой и помещают в отмывочный буфер. Отмывают до полного выхода несвязавшегося красителя.

9. Рассчитывают молекулярные массы по длине пробега.

10. Если гель предназначен для проведения блоттинга, то его вынимают, обрезают кармашки и подвергают следующей процедуре.

Необходимые растворы для электрофореза

Верхний и нижний электродные буфера: имеют один и тот же состав, только нижний буфер можно готовить на дистиллированной воде, а верхний на бидистиллированной воде. Обычно готовят буфер в 10 раз более концентрированный, а затем его разбавляют (1 часть буфера + 9 частей воды). **Состав:** 0,25 М трис + 1,92 М глицин + 1% ДДС-На (15,2 г трис + 72 г глицин + 5 г ДДС-На доводят до 500 мл бидистиллированной водой).

А – 30% акриламид + 0,8% бис-акриламид (на 150 мл бидистиллированной воды 45 г акриламида и 1,2 г бис-акриламида).

В – 1,5 М трис-HCl, pH 8,8 (13,6 г трис + вода до 75 мл, pH доводим HCl)

С – 0,5 М трис-НCl, pH 6,8 (1,8 г трис + вода до 30 мл, pH доводим HCl)

Д – 10% ДДС-Na (1 г ДДС-Na до 10 мл водой)

Е – 10% аммоний персульфат (0,1 г персульфата аммония до 1 мл водой)

Конечная концентрация разделяющего (рабочего) геля (на два геля нужно взять половину)

Объем, мл	5	7,5	10	12	12,5	13	14	15	17	20
А	5	7,5	10	12	12,5	13	14	15	17	20
В (8,8)	-				7,5	-				
Д	-				0,3	-				
Е	-				0,3	-				
TEMED	-				20мкл	-				
H ₂ O	17	14,5	12	10	9,5	9	8	7	5	2

Конечная концентрация концентрирующего (формирующего) геля на два геля

	Объем, мл
А	0,5
С (6,8)	0,8
Д	33 мкл
Е	33 мкл
TEMED	3 мкл
H ₂ O	1,8

Буфер для образца (Sample buffer) на 10 мл (pH 6,8)

1. 2,5 мл С (0,5 М Трис-НCl, pH 6,8)

2. 1,0 мМ ЭДТА (0,003 г или 0,5 мл 20 мМ ЭДТА)
3. 0,45 мкл бромфенолового синего (или 0,0058 г)
4. 1 г ДДС-Na
5. 2,0 мл глицерин

Все компоненты соединяют, приливают воду до 10 мл. При непосредственном использовании к 0,5 мл этого буфера добавляют 50 мкл меркаптоэтанола.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводят, в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя, в Towbin - буфере (25 мМ Трис-HCl, 192 мМ глицин, 10% метанол, pH 9,2). После переноса белков нитроцеллюлозную мембрану помещают в блокирующий раствор, содержащий 3% БСА, 3 мМ фосфатный буфер (pH 7.4) и 150 мМ NaCl (фосфатно-солевой буфер - ФСБ), и оставляют на ночь на холоду. Затем мембрану инкубируют в растворе первичных антител в ФСБ (1:1000) 1,5-2 ч на качалке, промывают 3 раза по 10 мин от непрореагировавших антител ФСБ, содержащим 0.05% Твин-20 (ФСБ-Твин). Мембрану помещают в раствор вторичных антител (1:1000), конъюгированных со щелочной фосфатазой ("Sigma", США), и инкубируют 1,5-2 ч на качалке. После инкубации мембрану вновь отмывают в ФСБ-Твин от непрореагировавших антител 3 раза по 10 мин, помещают в раствор, содержащий 100 мМ Трис-HCl (pH 9.5), 100 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 0.17 мг/мл 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата ("Sigma", США), 0.33 мг/мл нитротетразолия синего ("Sigma", США), и инкубируют до появления окраски. Для сохранения окраски мембрану помещают в раствор, содержащий 20 мМ Трис-HCl (pH 2.9), 1 мМ ЭДТА, высушивают и хранят в темном месте.

Ход проведения иммуноблоттинга

1. В буфере для переноса замачивают нитроцеллюлозную мембрану.

2. Собирают пластины. На дно ванночки, в которую заливают буфер укладывают пластину, на нее синтепон, на синтепон укладывают ватман (кусочки вырезаны по размеру). На ватман укладывают нитроцеллюлозную мембрану, сверху гель, на гель кусок ватмана, сверху синтепон и закрывают пластиной. Следят, чтобы на синтепоне и мембране не было воздуха. Пластины плотно прижимают.

3. Специальный прибор для блоттинга заливают охлажденным буфером. Вставляют пластины так, чтобы пластина с мембраной была соединена с плюсом. Закрывают крышкой с электродами и подсоединяют к прибору. Включают напряжение, чтобы оно составляло 200 на 400. Блоттинг проводят в холодной комнате в течение 3 ч.

4. После окончания отключают прибор, вынимают электроды, сливают буфер. Пластины вынимают, мембрану вынимают, помещают в раствор красителя Roanсе. Сразу же (через 1 мин) прополаскивают дистиллированной водой, отмечают маркерные белки, треки и направление.

5. Заливают мембрану блокирующим раствором и оставляют на ночь в холодильнике.

6. Утром сливают блокирующий буфер, мембрану промывают TTBS (3 раза по 10 мин) и проводят окрашивание.

Буфер для переноса: 3,03 г трис + 14,4 г глицин + 100 мл метанол доводят до 1 л бидистиллированной водой (рН 9,2 не доводят).

Ход проведения окрашивания мембраны

1. Мембрану после промывания заливают раствором первичных антител (в зависимости от свежести антител на время от 30 мин до 2 ч).
2. Отмывают ТТBS (2 раза по 10 мин).
3. Заливают раствором вторичных антител (на 1 ч).
4. Отмывают ТТBS (2 раза по 10 мин).
5. Заливают буфером с pH 9,5 на 5 мин.
6. Помещают мембрану в раствор красителя (от 2 до 5 мин) до появления окраски.
7. Отмывают ТТBS (2 раза по 5 мин).
8. Для сохранения окраски помещают в раствор с pH 2,9 на 5 мин.
9. Промывают дистиллированной водой, высушивают на фильтровальной бумаге, хранят в темноте.
10. Мембрану сканируют, по белкам-маркерам определяют молекулярные массы полипептидов.

Необходимые растворы:

TBS, pH 7,5:

На 1 л бидистиллированной воды 2,42 г трис, 27,24 г NaCl, довести pH до 7,5 с помощью HCl.

TTBS, pH 7,5: на 1000 мл TBS добавить 500 мкл Твин-20.

pH 9,5: 100 mM трис, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

На 100 мл бидистиллированной воды – 1,21 трис + 0,580 г NaCl + 0,0476 г MgCl₂, довести pH до 9,5 с помощью HCl.

pH 2,9 (Stop solution): 20 mM трис, 1 mM ЭДТА.

На 100 мл бидистиллированной воды - 0, 242 г трис + 0,037 г ЭДТА, довести pH 2,9 с помощью HCl.

Красящий раствор: 100 мМ Трис-HCl (pH 9.5) + 100 мМ NaCl + 5 мМ $MgCl_2$ + 0.17 мг/мл 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата (BCIP) + 0.33 мг/мл нитротетразолия синего (пВТ).

На одну мембрану: 150 мкл BCIP (2,55мг растворяют в 150 мкл H_2O) + 150 мкл пВТ (4,95 мг растворяют в 70% ДМФО) + 15 мл буфера 9,5. Красители BCIP и пВТ хранят в морозильной камере в темноте, готовят непосредственно перед окрашиванием.

3 Иммуноэлектрофоретические методы

Сущность метода иммунохимии.

Иммунохимический метод анализа белков основан на реакции специфического взаимодействия антиген-антитело. В этой реакции проявляется одна из элементарных биологических функций макромолекулы белка - способность к специфическому взаимодействию по принципу "узнавания". При этом чувствительность метода такова, что для выявления различий между двумя белками достаточно минимальной разницы в первичной структуре полипептида: например, замены или перестановки лишь одной аминокислоты в антигенной детерминанте.

Специфичность и высокая чувствительность иммунохимической реакции позволяет использовать ее в анализе ничтожно малых количеств белка - антигена. Хорошими иммунными сыворотками можно обнаружить в одном мл жидкости всего 1 мкг, а в некоторых случаях - 0.1 мкг белка (Конарев, 1983).

Взаимодействие антигенов и антител.

Взаимодействие антитела с антигеном представляет собой кооперативный процесс, в котором наряду с соответствием друг другу активного центра и антигенной детерминанты такое же

важное значение имеет общая конформация их носителей, то есть макромолекул иммуноглобулина и белка - антигена.

Основные типы молекул иммуноглобулинов, в том числе и кроличьих, имеют по два активных центра, то есть являются двухвалентными. Они могут присоединять две молекулы антигена с одной детерминантной группой. Комплексы таких размеров обычно растворимы. Если антиген имеет две детерминантные группы, может образоваться длинная цепь: ...-Аг-Ат-Аг-Ат-Аг-... Если антиген имеет три детерминантные группы и более, то образуются разветвленные цепи, решетчатые структуры.

Полимеры такого типа нерастворимы, и реакция антиген-антитело сопровождается выпадением осадка, или преципитата. При большом избытке антигена преципитаты растворяются. Это происходит благодаря тому, что свободные молекулы антигена конкурируют за молекулы антител, в результате чего нерастворимая решетка распадается на мелкие растворимые комплексы типа Аг-Ат-Аг (Остерман, 1983).

Среди иммунных сывороток, используемых в иммунохимических анализах, наиболее благоприятна по составу иммуноглобулинов кроличья. Она содержит наиболее однородные по физико-химическим свойствам (а также по N-концевым аминокислотам) антитела. К тому же преципитаты с антителами кроличьей сыворотки оказались очень слабо растворимыми в избытке антигена.

3.1 Иммуноэлектрофорез в агарозе.

Электрофорез белков проводят по Грабар и Уильямс (Остерман, 1983). На горизонтально расположенное предметное стекло наливают 5 мл расплавленного 1%-ного раствора агарозы, приготовленной на 0.025 М ацетат-барбиталовом буфере с pH 8.9, так, чтобы образовался слой геля толщиной 1.5 мм. Белковый препарат в объеме 50 мкл наносят в одну или две цилиндрические

лунки, изготовленные с помощью штампа-пробойника и расположенные на расстоянии 1.5 см от катодного края стекла, а также с помощью штампа прорезают продольные стенки канавок для антисыворотки, имеющих ширину 2 мм. Предметные стекла со слоем геля на них помещают на горизонтально расположенный столик прибора для электрофореза в агарозе и припаивают расплавом 1%-ного раствора агарозы к агарозным столбикам, находящимся в катодном и анодном отсеках прибора для электрофореза. В качестве электродного также используется 0.025 М ацетат-барбиталовый буфер с pH 8.9. Электрофорез проводится в течении двух часов при напряжении 6 - 8 В/см в холодной комнате при температуре 4⁰С. Момент окончания электрофореза определяют по времени достижения лидирующим красителем (бромфеноловый синий) края предметного стекла. После окончания электрофореза из канавок для антисыворотки извлекают агарозу и в них до уровня геля заливают разбавленную проявляющую антисыворотку. Диффузия разделенного электрофорезом белка и проявляющей антисыворотки и образование преципитата проводят в чашках Петри в холодильнике в течение трех суток. Затем в течение трех-четырех суток проводят отмывку препаратов 0.15 М водным раствором NaCl для удаления непрореагировавших антигенов и антител. Препараты высушивают и окрашивают 0.1% раствором амидового черного в 7% уксусной кислоте. Отмывка препаратов производится 7% уксусной кислотой до обесцвечивания фона.

Этот метод позволяет определить количество антигенов в белковой смеси и их относительную электрофоретическую подвижность, а также наличие или отсутствие в белковом препарате определенных антигенов (Рис. 19).

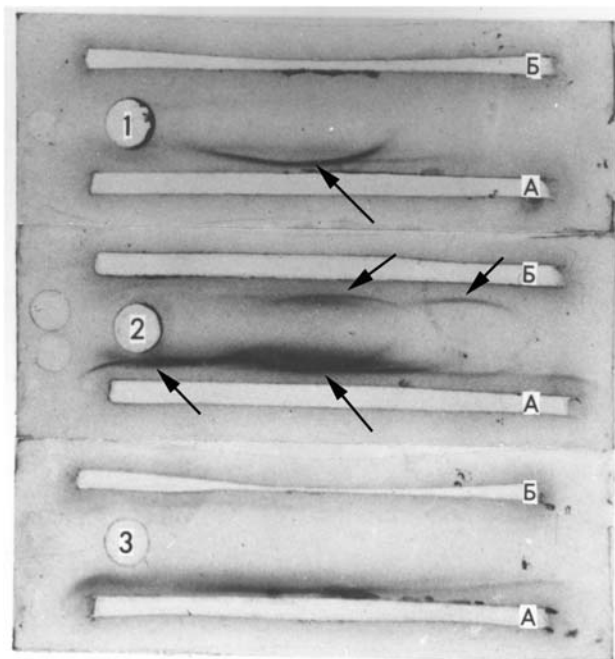


Рис. 19. Иммуноэлектрофорез в агарозе по Грабар и Уильямс. Стрелками показаны линии преципитации индивидуальных белков.

3.2 Перекрестный иммуноэлектрофорез.

Перекрестный иммуноэлектрофорез проводят по Лореллу в модификации Кларка и Фримена с незначительными изменениями (Остерман, 1983). Первую меру проводят так же, как и при описанном выше иммуноэлектрофорезе в агарозе по Грабар и Уильямс. На каждом предметном стекле пробивают две лунки для образцов, в которые вносят выровненные по количеству белка объемы раствора белкового препарата. Электрофорез первой меры

проводят при напряжении 6-8 В/см в течении двух часов при температуре 4⁰С.

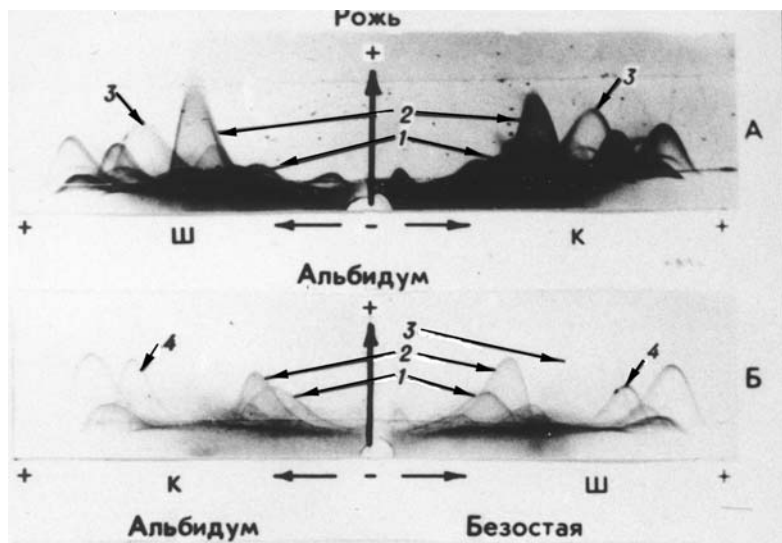


Рис. 20. Перекрестный иммуноэлектрофорез по Лореллу. Стрелками показаны линии преципитации индивидуальных белков.

После окончания первой меры иммуноэлектрофореза агарозный гель разрезают на две полосы параллельно направлению миграции белков и укладывают на обращенный к катоду край стеклянной пластинки размером 4.5 x 12 см. При этом направление разделения белков в первой мере должно быть от центра к обоим краям. Остальную часть пластинки заливают 12 мл расплавленной и охлажденной до 40⁰С агарозой в смеси с антисывороткой, приготовленной на 0.025 М ацетат-барбиталовом буфере с рН 8.9 так, чтобы новый слой геля имел такую же толщину, как полоса первого направления и сплавился с ней в один сплошной слой. Стекло со слоем геля на нем помещают на горизонтально расположенный столик прибора для электрофореза в агарозе и

припаивают расплавом 1%-ного раствора агарозы к агарозным столбикам, находящимся в катодном и анодном отсеках прибора для электрофореза. В качестве электродного также используется 0.025 М ацетат-барбиталовый буфер с pH 8.9. Электрофорез во втором направлении проводят при напряжении 3- 4 В/см в холодной комнате при 4°C в течение 20 часов.

Препараты отмывают 0.15 М водным раствором NaCl в течение пяти-семи суток с ежедневной сменой отмывающего раствора и высушивают. Окрашивают препараты водным раствором, содержащим 0.1% Кумасси R-250, 10% этилового спирта и 7% уксусной кислоты. Отмывка препаратов производится водным раствором, содержащим 25% этилового спирта и 7% уксусной кислоты до обесцвечивания фона (Рис. 20).

Этот метод позволяет определить количественное содержание каждого из антигенов в белковом препарате.

3.3 Рокет-иммуноэлектрофорез.

Рокет- иммуноэлектрофорез проводят в агарозе по Лореллу (Остерман, 1983). Иммуноэлектрофорез проводят на стеклянных пластинках размером 4.5 x 12 см . На пластинки наслаивают слой расплава 1%-ного раствора агарозы, приготовленного на 0.025 М ацетат-барбиталовом буфере с pH 8.9, термостатированного при 45°C и смешанного с антителами. На крае стекла, обращенном к катоду, пробойником просекают цилиндрические лунки для образцов. Стекло со слоем геля на нем помещают на горизонтально расположенный столик прибора для электрофореза в агарозе и припаивают расплавом 1%-ного раствора агарозы к агарозным столбикам, находящимся в катодном и анодном отсеках прибора для электрофореза. В качестве электродного также используют 0.025 М ацетат-барбиталовый буфер с pH 8.9. В лунки вносят рассчитанные объемы раствора белкового препарата, выровненные

по содержанию белка, и электрофорез проводят в холодной комнате при температуре 4⁰С и напряжении 3-4 V/см в течение 20 часов.

Препараты отмывают 0.15 М водным раствором NaCl в течение пяти-семи суток с ежедневной сменой отмывающего раствора и высушивают. Окрашивают препараты водным раствором, содержащим 0.1% Кумасси R-250, 10% этилового спирта и 7% уксусной кислоты. Отмывка препаратов производится водным раствором, содержащим 25% этилового спирта и 7% уксусной . кислоты до обесцвечивания фона (Рис. 21).

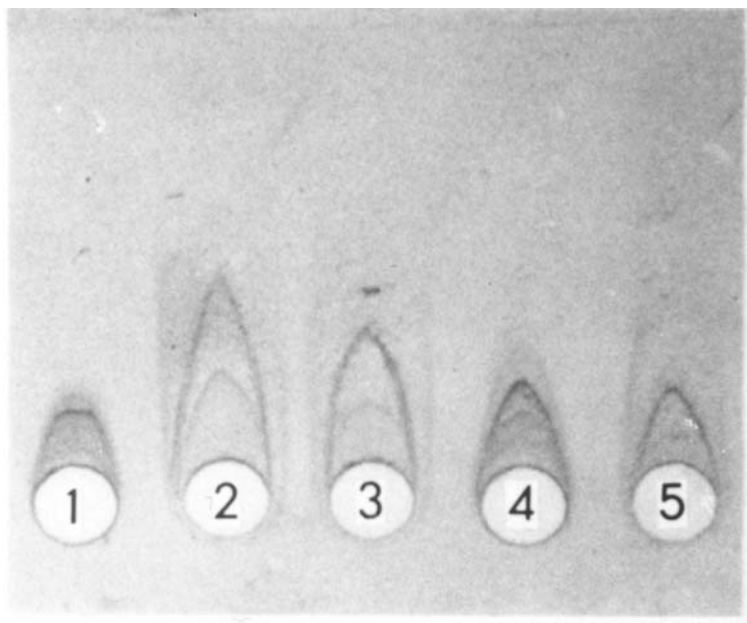


Рис. 21. Рокет-иммуноэлектрофорез

Этот метод позволяет, при наличии "узкой" или моноклональной сыворотки одновременно определять относительное содержание антигена в большом количестве

белковых препаратов. Расчет относительного изменения содержания антигена проводят, используя для построения калибровочной кривой ряд разведений белкового препарата, используемого в качестве контроля (Остерман, 1983).

Литература

- Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры.- М.: Колос, 1983.- 320 с.
- Голицын В.М. Неденатурирующий электрофорез. Фракционирование фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и белков плазмы крови // Биохимия. – 1999. Т.64, - С. 64-70.
- Колесниченко А.В., Остроумова Е.А., Зыкова В.В., Войников В.К. Белки четырех видов злаков, иммунохимически родственные стрессовому белку 310 кД // Физиол. Раст. – 2000, - Т. 47, - С. 199-202.
- Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры.- М.: Колос, 1983.- 320 с.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот (электрофорез и ультрацентрифугирование). - М.: Наука, 1985.- 305 с.
- Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. - М.: Наука, 1983. - 304 с.
- Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 358 С.
- Anderson L., Borg, H., Mikaelsson M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity // FEBS Lett. 1972. V. 20. P.199-202.
- Bers G., Garfin D. Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection // BioTechniques. – 1985. – V.3. – P.276-288.
- Brada D, Roth G. "Golden Blot"- detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by Protein A-gold complexes // Anal. Biochem. – 1984. – V.142. – P.79-82.

- Greenberg C.S., Craddock P.R. Rapid single-step membrane protein assay // Clin. Chem. – 1982. – V.28. – P. 1725-1726.
- Hsu Y-H. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper // Anal. Biochem. – 1984. – V.142. – P.221-225.
- Jansch L., Kruft V., Schmitz U.K., Braun H.P. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria // Plant J. – 1996. – V. 9, - P. 357-368.
- Kolesnichenko A., Ostroumova E., Zykova V., Voinikov V. The comparison of proteins with immunochemical affinity to stress protein 310 kD in cytoplasmatic proteins of winter rye, winter wheat, Elymus, and maize // J. Therm. Biol. 1999. V.24, N4. P.211-215.
- Kugler M., Jansch L., Kruft V., Schmitz U.K., Braun H.P. Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) // Photosynthesis Research. – 1997. – V. 53. – P. 35-44.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4 // Nature.- 1970.- V.227, N 5259. - P.680-685.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - V. 193. - P.265-275.
- Moeremans M., Daneels G., Van Dijck A, Langanger G., DeMey L. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining, // Immunol. Methods. – 1984. – V.74. – P.353-360.
- Surek B., Latsko E. Visualization of antigenic proteins blotted onto nitrocellulose using the immunogold-staining (IGS) method // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. - V.121. – P.284-289.
- Voyta C., Edwards B., Bronstein L. Ultrasensitive detection of alkaline phosphatase activity // Clin. Chem. – 1988. – V.34. – P.1157.

4 РАБОТА С ПРИБОРАМИ

А. Работа с универсальным иономером ЭВ-74

1. Перед началом работы

1.1. Проверить целостность корпуса преобразователя и кабелей измерительного и вспомогательного электродов; проверить наличие заземляющей клеммы.

1.2. Проверить заполненность измерительного электрода насыщенным раствором хлористого калия. Открыть отверстие на измерительном электроде.

1.3. Включить прибор за 30 мин до начала работы.

1.4. С помощью ручки «Температура раствора» установить температуру, соответствующую температуре измеряемого раствора. Ручками «Калибровка» и «Крутизна» настраивают прибор по контрольным растворам (рН 7,0 и рН 9,0).

1.5. Электроды промывают в дистиллированной воде, обсушивают фильтровальной бумагой и приступают к измерению.

2. Последовательность измерения рН раствора

2.1. Нажимают кнопку « t^0 » и устанавливают ручку «Температура раствора» а положение, соответствующее температуре исследуемого раствора.

2.2. Погружают электроды в стаканчик с раствором.

2.3. Нажимают кнопку одного из диапазонов измерения, кроме -1 ÷ 19.

2.4. Нажимают кнопку рХ, доводят значение рН исследуемого раствора до нужного значения, ориентируясь на стрелку

показывающего прибора. Обычно время установления показаний прибора составляет 3 мин.

2.5. После окончания измерения нажимают кнопку «t⁰».

2.6. Вынимают электроды из раствора, промывают дистиллированной водой, обсушивают и погружают в стакан с дистиллированной водой.

2.7. Закрывают отверстие на измерительном электроде.

3. Во всех случаях, когда измерение непосредственно не производится, должна быть нажата кнопка «t⁰».

Б. Работа на центрифуге К-24



Рис. 22. Общий вид центрифуги К-24

К работе на центрифугах допускаются сотрудники не моложе 18 лет, ознакомленные с правилами ее эксплуатации и данной инструкцией.

1. Перед началом работы

- 1.1. Центрифуга должна быть обязательно заземлена.
- 2.2. Кнопка рефрижератора должна быть в рабочем положении.
- 3.3. Режимы работы рефрижератора предварительно подбираются экспериментально.

2. Во время работы

2.1. Ни в коем случае не пускать в ход центрифугу без насаженного ротора, в противном случае произойдет изгиб и излом гибкого вала.

2.2. Ротор следует насадить на поводок, при этом необходимо обратить внимание на то, чтобы он вошел в зацепление с двумя штифами. Насадку и смену роторов следует проводить в строго вертикальном положении, чтобы избежать повреждений гибкого вала.

2.3. Центрифужные пробирки необходимо точно уравновешивать и симметрично распределять в роторе

2.4. Пуск двигателя центрифуги в ход осуществляется плавным движением ручки регулировки числа оборотов с нулевого положения по направлению вращения часовой стрелки.

2.5. При пуске в ход ток не должен быть выше 3-х ампер.

Не открывать центрифугу до полной остановки ротора.

3. По окончании работы

3.1. Привести все кнопочные выключатели на панели центрифуги в положение «выключено», а ручку регулировку числа оборотов в «0» положение и только после этого вынуть сетевую питательную вилку.

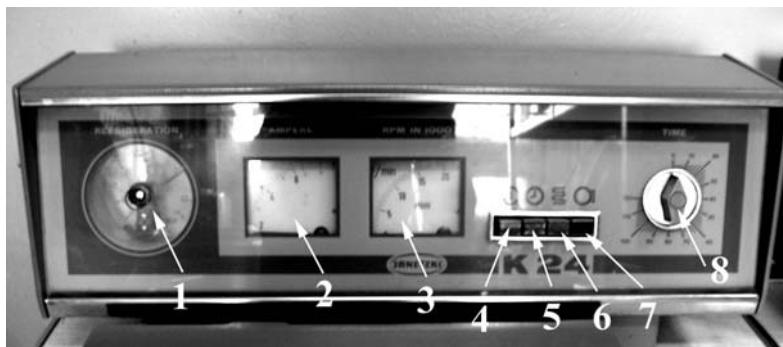


Рис. 23. Панель управления центрифуги К-24.

Обозначения: 1- индикатор температуры; 2- амперметр; 3- индикатор оборотов; 4- кнопка включения; 5- кнопка включения таймера; 6- кнопка включения рефрижератора; 7- кнопка включения тормозного механизма; 8- таймер.

В. Работа на центрифуге Jouan GR 20 22

Центрифуга Jouan GR 20 22 является современной высокоскоростной центрифугой, предназначенной для разделения веществ с помощью высокого центробежного ускорения. Контрольная система центрифуги позволяет регулировать скорость, ускорение и торможение, время работы и температуру. Ротор Jouan - AG 100.14 позволяет получать величины углового ускорения вплоть до 23885 g.



Рис. 24. Общий вид центрифуги фирмы Jouan

1 Перед началом работы

1.1 Центрифуга должна быть обязательно выровнена по горизонтальному уровню и заземлена.

1.2 Ротор должен быть охлажден до температуры камеры центрифуги для предотвращения застревания ротора на приводной головке. Гайки крепления крышки и болт крепления ротора должны быть слегка смазаны силиконовой вакуумной смазкой и легко двигаться.

1.3 Центрифужные пробирки необходимо точно уравнивать и симметрично распределять в роторе

2 Установка ротора и начало работы

2.1 Ни в коем случае не пускать в ход центрифугу без насаженного ротора, в противном случае произойдет изгиб и излом гибкого вала.

2.2 Поместить крышку на ротор и крепко завинтить по часовой стрелке при помощи специального ключа Аллена. Осторожно опустить ротор на место так, чтобы центровочные отверстия снизу ротора находились на одной линии с пальцами наверху привода.

2.3 Центрифужные пробирки необходимо точно уравнивать и симметрично распределять в роторе

2.4 В случае использования программы, воспроизведенной на дисплее, для начала запрограммированного цикла нужно нажать кнопку “START”. В случае необходимости вызова одной из заранее введенных программ необходимо нажать кнопку “RCL”. На дисплее воспроизводится следующая информация

Recall Prog. No : X – вызов программы

Необходимо либо принять предложенный номер программы и нажать кнопку “ENTER”, либо ввести другой номер программы и также нажать кнопку “ENTER”. Для начала запрограммированного цикла нужно нажать кнопку “START”. Программирование параметров центрифугирования производится в соответствии с инструкцией по эксплуатации центрифуги.

2.5 После нажатия кнопки “START” на дисплее появляется движущийся символ, означающий, что двигатель находится во вращении. В это время на дисплее

отображаются: фактические об/мин; оставшееся время; температура роторной камеры.

2.6 Остановка центрифуги осуществляется автоматически после окончания заданного времени центрифугирования. Открытие крышки возможно только после полной остановки ротора, автоматического разблокирования и подачи звукового сигнала.

3 *После работы*

3.1 Открыть крышку центрифуги, снять ротор и специальным ключом Аллена снять крышку ротора, извлечь контейнеры с образцами и просушить ротор. В случае необходимости после окончания работы протереть насухо роторную камеру центрифуги.



Рис. 25. Панель управления центрифуги фирмы Jouan GR 20 22.

Г. Работа на полярографе ОН-105

Настоящая инструкция устанавливает порядок работы на полярографе, магнитной мешалке и ультратермостате.

1. Перед началом работы

1.1. Необходимо проверить сохранность изоляции электрических проводов, целостность камеры термостатирования.

1.2. Все приборы должны быть заземлены (полярограф, ультратермостат, самописец, мешалка).

2. Во время работы

2.1. Подключение приборов к сети производится при всех выключенных кнопочных выключателях.

2.2. При приготовлении и внесении растворов ингибиторов и разобщителей пользоваться автоматическими пипетками. После каждого опыта электрод промывается спиртом и дистиллированной водой.

2.3. Промывание электрода эфиром проводить под тягой.

3. По окончании работы

3.1. Привести все кнопочные выключатели в положение «выключено» и после этого отключить прибор от сети. Все реактивы убрать в специально отведенное место.

5 СПРАВОЧНЫЕ ДАННЫЕ

Концентрации растворов

Процентная концентрация – число граммов растворенного вещества на 100 г раствора (но не в 100 мл растворителя). 1 г в 100 мл равен 1%.

Молярная концентрация – число молей растворенного вещества на 1 л раствора (но не в 1 л растворителя). Молем (грамм-молекулой) какого-либо вещества называют его молекулярную массу (молекулярный вес), выраженную в граммах. 1 М равен 1000 мМ, а 1 мМ равен 1000 мкМ.

Нормальная (эквивалентная) концентрация – число эквивалентных масс (грамм-эквивалентов) растворенного вещества на 1 л раствора. Раствор, содержащий в 1 л один грамм-эквивалент вещества, называется однонормальным или нормальным.

Моляльная концентрация – число молей растворенного вещества на 1000 г растворителя.

Молекулярные веса некоторых веществ

α -Кетоглутаровая кислота (2-оксоглутаровая кислота)	146,1
5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат (BCIP)	370,4
Аденозиндифосфат (АДФ)	449,19
Аденозинтрифосфат (АТФ)	551,15
Акриламид	71,1
Бензгидроксамовая кислота (БГК)	137,0
Бромфеноловый синий	691,9
Гидроксид калия	56,1

Гидроксид натрия	40,0
Глицин	75,1
Глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая)	147,0
Додecilсульфат натрия (ДДС-Na)	288,4
Карбонилцианидтрифторфенилгидразон (КЦФГ)	204,0
Малоновая кислота	104,06
Морфолинпропансульфоновая кислота (MOPS)	209,3
Нитротетразолиум синий (nBT)	817,6
Персульфат аммония	228,2
Ротенон	384,0
Сахароза	342,3
Трис (гидроксиметиламинометан)	121,1
Трихлоруксусная кислота (ТХУ)	163,4
Фенилметилсульфонилфлюорид (ФМСФ)	174,2
Фосфат калия	136,0
Хлорид калия	74,55
Хлорид магния	95,2
Хлорид натрия	58,5
Цианид калия	65,12
Цистеин	121,2
Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)	372,0
Яблочная кислота	134,09

Расчет числа оборотов ротора центрифуги, необходимого для достижения определенного ускорения центрифугирования

Центрифугирование основано на седиментации частиц в возрастающем гравитационном поле. Установка параметров центрифугирования состоит из определения времени, в течение которого образец подвергается выбранному ускорению центрифугирования. Ускорение центрифугирования рассчитывается исходя из скорости вращения двигателя (об/мин). Данная скорость вращения соответствует ускорению центрифугирования, которое прямо пропорционально радиусу центрифугирования согласно следующей формуле.

"Число g" (ускорение) = $1,118 \times R$ (радиус центрифугирования, мм) $\times N^2$ (скорость, тыс. об/мин)

Исходя из этой формулы можно рассчитать величину g если известно число оборотов или число оборотов (об/мин) по известной величине g.

Существует другой вид расчетов числа оборотов (об/мин) по заданной величине g и величины g по заданному числу оборотов, который основан на их определении по номограмме (Рис. 26).

Пользование номограммой. В первом столбце цифр приведены величины радиуса ротора, который рассчитывается как расстояние от оси вращения ротора до основания центрифужного стакана или пробирки. Второй и третий столбцы - величины g. Четвертый и пятый столбцы - число оборотов в мин. Для того чтобы определить число оборотов по заданной величине g необходимо соединить цифровое значение радиуса насадки (которое дано в рекомендации к центрифуге или определяется самим экспери-

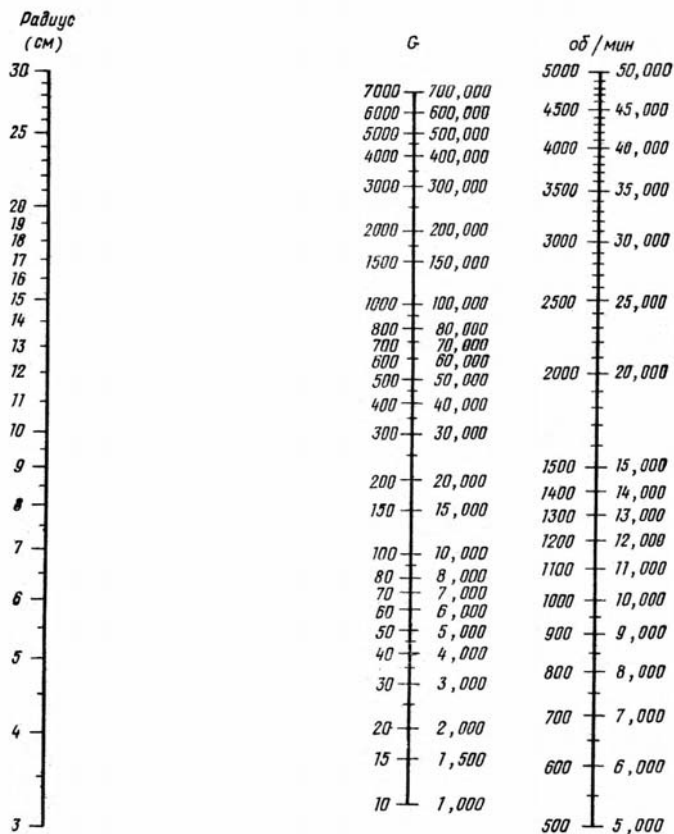


Рис. 26. Номограмма расчета числа оборотов по заданной величине g и величины g по заданному числу оборотов (по Кочетков Г.А. Практическое руководство по энзимологии, М.: Высшая школа, 1980, 272 с.).

ментатором) с цифровым значением величины g и в четвертой или пятой колонках (в зависимости от того в какой колонке находится заданная величина g - во второй или третьей) определяют количество оборотов, которое соответствует заданной величине g /
Определение величины g по заданному числу оборотов проводят аналогичным образом.

**Растворимость кислорода в дистиллированной воде при
различных температурах при нормальном атмосферном
давлении***

Температура, °C	Растворимость, мкм,л	Температура, °C	Растворимость, мкм,л
0	460	16	310
1	455	17	303
2	435	18	297
3	424	19	291
4	413	20	285
5	402	21	279
6	392	22	273
7	382	23	268
8	373	24	263
9	364	25	258
10	355	26	253
11	347	27	248
12	339	28	244
13	331	29	239
14	324	30	235
15	316		

* цит. по Зеленский, 1986

Бумага офсетная. Печать трафаретная.
Гарнитура Times New Roman. Усл. печ. л. 4,1 Уч.-изд. л. 3,12
Отпечатано в ООО «НПК Промэкобезопасность»
Тираж 300 экз. Заказ № 175