

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Н.В. Селиванова,
Д.Н. Федорин,
А.Т. Епринцев

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ
ГЛИОКСИЛАТНОГО ЦИКЛА И ЦТК**

Учебно-методическое пособие для вузов
(практикум)

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2014

Содержание

Введение.....	5
Раздел I. Выделение и количественное определение белка	6
Работа 1. Определение концентрации белка биуретовым методом	7
Работа 2. Определение концентрации белка микробиуретовым методом	8
Работа 3. Определение белка по Лоури	9
Работа 4. Количественное определение белка по методу Бредфорда	10
Работа 5. Спектрофотометрический метод определения белка	11
Раздел II. Выделение, очистка и определение активности ферментов глиоксилатного цикла и ЦТК.....	12
Работа 6. Выделение, очистка и определение активности аконитатгидратазы	14
Работа 7. Выделение, очистка и определение активности изоцитратдегидрогеназы	16
Работа 8. Выделение, очистка и определение активности изоцитратлиазы	18
Работа 9. Выделение, очистка и определение активности малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37)	20
Работа 10. Выделение, очистка и определение активности малатсинтазы	22
Работа 11. Выделение, очистка и определение активности сукцинатдегидрогеназы	24
Работа 12. Выделение, очистка и определение активности фумаратгидратазы	27
Раздел III. Определение субклеточной локализации ферментов	28
Работа 13. Разрушение клеточных структур	31
Работа 14. Дифференциальное центрифугирование гомогената	33
Работа 15. Выделение интактных митохондрий	34

ет образование определенного количества вещества в минуту, и т.д. Тогда удельную активность фермента, которая является мерилем чистоты ферментного препарата, выражают числом единиц в 1 мг вещества (белка).

2. Для целей определения ферментов могут быть использованы не только измерение поглощения света, но также измерения флюоресценции – **спектрофлюорометрические** методы. Такое определение активности фермента в ряде случаев по чувствительности превосходит спектрофотометрические методы на целый порядок величины. Некоторые коферменты и субстраты обладают сильной флюоресценцией. НАД и НАДФ в восстановленном состоянии имеют сильную флюоресценцию и не флюоресцируют в окисленном состоянии. Поэтому спектрофлюорометрию используют для изучения кинетики и механизма действия никотинамидных и флавиновых ферментов.

3. В основе **колориметрических** (фотометрических) методов лежит измерение при помощи визуального или фотоэлектрического колориметра окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии субстрата или продукта действия фермента со специфическими реактивами, которые обычно добавляются в фиксированную опытную пробу, взятую после остановки ферментативной реакции. Данные методы весьма разнообразны.

4. **Манометрические** методы используются при определении активности фермента в тех случаях, когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии. К таким реакциям относятся главным образом те, которые связаны с процессами окисления и декарбоксилирования, сопровождающимися поглощением или выделением кислорода и углекислоты, а также реакции, в которых выделение или связывание газа происходит в результате взаимодействия продуктов ферментативного превращения с добавленным в систему реактивом. Наблюдение за ходом реакции во времени проводится в специальных приборах – манометрических аппаратах Варбурга.

5. **Другие** методы. Сюда относится обширный ряд методов, включающих поляриметрию, вискозиметрию, потенцио- и кондуктометрические измерения и т.п. Также определение активности можно выполнять, используя методы хроматографии и электрофореза на бумаге. Эти методы высокочувствительны и специфичны, что делает их во многих случаях незаменимыми; они позволяют значительно сократить расход фермента на измерение активности, но не всегда применимы ввиду продолжительности разделения веществ в процессе хроматографии (и электрофореза).

Раздел I. Выделение и количественное определение белка

Белки (протеины, полипептиды) – высокомолекулярные органические вещества, состоящие из соединенных в цепочку пептидной связью альфа-аминокислот. В живых организмах аминокислотный состав белков определя-

ется генетическим кодом, при синтезе в большинстве случаев используется 20 стандартных аминокислот. Множество их комбинаций дают большое разнообразие свойств молекул белков. Кроме того, аминокислоты в составе белка часто подвергаются посттрансляционным модификациям, которые могут возникать и до того, как белок начинает выполнять свою функцию, и во время его «работы» в клетке. Часто в живых организмах несколько молекул белков образуют сложные комплексы, например, фотосинтетический комплекс.

Функции белков в клетках живых организмов более разнообразны, чем функции других биополимеров – полисахаридов и ДНК. Так, белки-ферменты катализируют протекание биохимических реакций и играют важную роль в обмене веществ. Некоторые белки выполняют структурную или механическую функцию, образуя цитоскелет, поддерживающий форму клеток. Также белки играют важную роль в сигнальных системах клеток, при иммунном ответе и в клеточном цикле.

Как правило, белки сохраняют структуру и, следовательно, физико-химические свойства, например, растворимость в условиях, таких как температура и pH, к которым приспособлен данный организм. Резкое изменение этих условий, например, нагревание или обработка белка кислотой или щелочью приводит к потере четвертичной, третичной и вторичной структур белка, называемой денатурацией. Самый известный случай денатурации белка в быту – это приготовление куриного яйца, когда под воздействием высокой температуры растворимый в воде прозрачный белок овальбумин становится плотным, нерастворимым и непрозрачным. Денатурация в некоторых случаях обратима, как в случае осаждения (преципитации) водорастворимых белков с помощью солей аммония, и используется как способ их очистки.

Работа 1. Определение концентрации белка биуретовым методом

Основы метода

Биуретовый метод – один из колориметрических методов количественного определения белков в растворе. Разработан в 1949 году Горналлом, Бардавиллом и Дэвидом, ныне мало используется в биохимической лабораторной практике (за исключением медицинских анализов на белок) из-за низкой чувствительности. Основан на образовании биуретового комплекса (имеет фиолетовый цвет) пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди. В методе используют т. н. биуретовый реактив, состоящий из KOH, CuSO₄ и цитрата натрия (или тартрата натрия). В образовавшемся комплексе медь связана с 4 азотами координационными связями, а с 2 кислородами – электростатическими. Полноценный комплекс образуется лишь с пептидами, состоящими более чем из 4 остатков. Оптическую плотность раствора (прямо пропорциональную концентрации пептида) определяют при 540–560 нм.

К достоинствам метода стоит отнести его низкую чувствительность к посторонним веществам, невысокую погрешность.

Чувствительность метода – 2–10 мг/мл.

Оборудование, реактивы, материалы

ФЭК; градуированные пипетки на 1 и 5 мл; карандаш по стеклу; пробирки. Биуретовый реактив: растворяют в 250 мл воды 0,75 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 3 г виннокислого натрия-калия ($\text{Na} \cdot \text{KC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), затем при энергичном помешивании добавляют 150 мл 10%-го раствора NaOH , свободного от Na_2CO_3 , и 1 г KI для предотвращения самопроизвольного восстановления; объем доводят водой до 1 л. Материалы: 1%-й водный раствор яичного альбумина; плазма крови в разведении 1 : 200.

Ход работы

К 1 мл исследуемого раствора, содержащего 1–10 мг белка, прибавляют 4 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют стоять 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени колориметрируют при длине волны 540 нм против воды. Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику, составленному для альбумина: в серию пробирок вливают 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 и 1,0 мл 0,1%-го водного раствора яичного альбумина, содержащего от 1 до 10 мг белка, доводят объем раствора дистиллированной водой до 1 мл, перемешивают, добавляют в каждую пробирку по 4 мл биуретового реактива, перемешивают и через 30 мин колориметрируют.

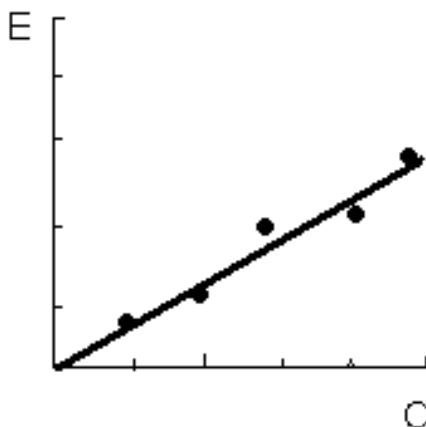


Рис. 1. Калибровочный график для определения содержания белка.

Е – оптическая плотность, С – количество белка, мкг

Работа 2. Определение концентрации белка микробиуретовым методом

Основы метода

Микробиуретовый метод – основан на взаимодействии пептидных связей с Cu^{2+} в щелочной среде. В результате реакции образуется комплекс, окрашенный в фиолетовый цвет.