

Современные проблемы биохимии

Методы исследований

Современные проблемы биохимии

Методы исследований

*Допущено
Министерством образования
Республики Беларусь
в качестве учебного пособия
для магистрантов учреждений
высшего образования,
по биологическим
и медицинским специальностям*

Под редакцией профессора А.А. Чиркина



Минск
«Вышэйшая школа»
2013

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73
С56

Авторы: Е.В. Барковский, С.Б. Бокуть, А.Н. Бородинский, В.У. Буко, О.И. Валентюкевич, А.И. Грицук, Е.О. Данченко, Е.М. Дорошенко, И.К. Дремза, А.С. Дроздов, И.Б. Заводник, Л.Б. Заводник, Д.Я. Задорожный, Л.М. Караедова, В.Н. Кипень, Е.И. Коваленко, Е.А. Лапшина, Т.Л. Лебедь, О.Я. Лукивская, Г.В. Ляхнович, А.Ф. Макарчиков, С.Б. Мельнов, Е.В. Морозова, И.М. Морозова, Л.И. Надольник, Е.Е. Нарута, В.Н. Никандров, Л.Н. Николаевич, Н.В. Пивень, Н.С. Пыжова, В.Ю. Смирнов, Э.П. Титовец, Т.А. Толкачева, В.В. Хрусталеv, В.Т. Чещевик, А.А. Чиркин

Рецензенты: кафедра биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета (заведующий кафедрой доцент *И.В. Семак*); заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» доктор биологических наук *В.Н. Решетников*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства

Современные проблемы биохимии. Методы исследований : учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.] ; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. шк., 2013. – 491 с. : ил.

ISBN 978-985-06-2192-4.

Учебное пособие составлено из трудов специалистов-биохимиков Республики Беларусь.

Изложено 190 методик биохимического исследования различных биологических объектов на различных уровнях их организации.

Для магистрантов учреждений высшего образования по биологическим и медицинским специальностям.

Может быть полезно студентам биологических, медицинских, ветеринарных и фармацевтических специальностей, а также исследователям-биохимикам.

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-06-2192-4

© Оформление. УП «Издательство
«Вышэйшая школа»», 2013

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие создано в соответствии с учебным планом и базовой программой подготовки студентов по специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность); специализация 1-31 01 01-02 05 Биохимия. Этот предмет завершает подготовку специалистов в 10-м семестре обучения студентов и предназначен для ознакомления обучающихся с характером биохимических исследований, проводимых в ряде вузов Министерства образования и научно-исследовательских институтах Национальной академии наук Республики Беларусь. Учебное пособие не претендует на исчерпывающую информацию о многогранных биохимических исследованиях белорусских ученых. Данное издание должно продемонстрировать то, что биохимические методы исследования активно внедряются в фундаментальные и прикладные исследования не только в общепризнанных и авторитетных научных и педагогических центрах г. Минска, но и в других городах республики.

Изучение современных проблем биохимии служит для достижения основной цели: подготовить выпускника-биохимика к профессиональной деятельности и сократить время его адаптации к решению научных, производственных и учебных биохимических задач. В соответствии с этим пособие включает материалы по применению биохимических методов *in silico* (компьютерное моделирование), *in vitro* и *in vivo*. В материалах книги содержится более 190 методик биохимического анализа, 50 таблиц, более 90 рисунков, около 200 источников литературы. Потребность в таком издании вызвана тем, что стремительное развитие технологий биохимических исследований сокращает навыки биохимика-исследователя до этапа пробоподготовки, а остальное выполняют приборы.

Наряду с классическими методами выделения и изучения ферментов, оценки обмена белков, углеводов, липидов, нукле-

иновых кислот, состояния энергетического обмена, свободно-радикальных процессов в пособии представлены методы иммунохимического анализа, молекулярно-генетических исследований, анализа данных банков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей макромолекул, исследование нанофлюидики. В практическом отношении будут полезными методики изучения фагоцитоза, апоптоза, некроза, биохимических характеристик тканей животного и растительного происхождения.

Глава 1 написана В.В. Хрустальевым, Е.В. Барковским, Д.Я. Задорожным; гл. 2 – А.С. Дроздовым, С.Б. Бокутем; гл. 3 – А.Ф. Макаровичем; гл. 4 – Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирновым; гл. 5 – В.Н. Никандровым, Н.С. Пыжовой; гл. 6 – Л.И. Надольник, О.И. Валентюкевичем; гл. 7 – А.И. Грицуком; гл. 8 – Э.П. Титовцом; гл. 9 – Л.М. Караедовой; гл. 10 – А.Н. Бородинским, И.К. Дремзой; гл. 11 – В.У. Буко, О.Я. Лукивской, Е.Е. Нарутой; гл. 12 – Л.Б. Заводником, Е.А. Лапшиной, В.Т. Чешевиком, И.К. Дремзой, И.Б. Заводником; гл. 13 – Е.И. Коваленко, А.А. Чиркиным; гл. 14 – Е.О. Данченко; гл. 15 – Н.В. Пивень; гл. 16 – С.Б. Мельновым, Т.Л. Лебедь, В.Н. Кипенем; гл. 17 – Т.А. Толкачевой, И.М. Морозовой, Г.В. Ляхновичем; гл. 18 – Е.В. Морозовой, Л.Н. Николаевич, А.А. Чиркиным.

ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИЗА

Среди универсальных механизмов регуляции метаболизма и функций организма важное место занимают *реакции протеолиза*. Они реализуются во всех живых организмах, играют важную роль в репродукции вирусов и, по-видимому, в трансформации белка прионов в его патологическую форму – PrP^{sc} – и амплификации этого патологического белка.

Значение протеолиза в жизнедеятельности клетки сопоставимо с таковым клеточного дыхания, а в некоторых случаях и превосходит его. Известен ряд организмов, являющихся облигатными анаэробами и не нуждающихся в кислороде. В то же время без протеолитических реакций такие организмы не обходятся. Примером могут служить возбудители газовой гангрены – *Clostridium perfringens*, *Clostridium histolyticum*.

5.1. Биологическая роль протеолиза

Протеолиз тотальный (расщепление белка до малых пептидов и АК) обычен для пищеварения, разрушения удаляемых из биосистемы белков, а *ограниченный* (расщепление в белке немногих пептидных связей, часто даже одной) – для регуляции целого ряда биохимических процессов.

Фактически во всех основных патологических процессах реакции протеолиза играют ключевую роль, так как без них немыслимы гемостаз, регуляция кровяного давления, модификация неклоточного матрикса, миграция клеточных элементов, ряд иммунных реакций, метастазирование опухолей и т.д. Только у человека известно по меньшей мере 70 заболеваний, обусловленных дефектами генов, кодирующих образование компонентов протеолиза. Именно в силу этих обстоятельств компоненты протеолиза, соединения, ингибирующие отдельные реакции, используются в клинической медицине в качестве средств заместительной и патогенетической терапии. Реакции протеолиза используются также в качестве диагностических тестов при разнообразных заболеваниях. Поле исследовательской деятельности необычайно широко, что обусловлено прежде всего разнообразием протеолитических реакций и вовлекаемых в данные реакции соединений. Фактически каждый год литература сообщает о новых протеиназах, их субстратах, ингибиторах. Накапливаются все новые материалы о значении реакций протеолиза в патогенезе ряда заболеваний.

Тем не менее возможности оценки состояния звеньев протеолиза в регуляции физиологических процессов или в диагностическом плане пока используются в ограниченном масштабе. Более того, несмотря на чрезвычайно большую значимость проблемы протеолиза, структурно-функциональная организация его системы, регуляция ее на молекулярном, клеточном и системном уровнях, механизм расщепления протеиназами пептидной связи далеки от решения. Это логически стимулирует дальнейшие исследования механизмов регуляции протеолиза, прежде всего на молекулярном и клеточном уровнях.

За раскрытие механизма лишь одного из путей внутриклеточного протеолиза – убиквитин-опосредованного АТФ-активируемого – израильские исследователи А. Цехановер, А. Герш-

ко и И. Роуз удостоены Нобелевской премии 2004 г. в области химии.

Методы исследования протеолиза многообразны, но большинство их сводится к регистрации расщепления низкомолекулярных субстратов или же белков.

С помощью низкомолекулярных субстратов была получена ценная информация о первичной и вторичной субстратной специфичности ряда протеиназ, конфигурации активного центра, субстрат-связывающего участка, определены константы кинетики реакций. Такие субстраты достаточно стандартны. Однако чрезвычайно важно значение протеолиза для расщепления именно белков. И хотя стандартизировать такие субстраты сложнее (что, кстати, может являться причиной расхождения в результатах анализа одних и тех же реакций разными исследователями), при изучении их расщепления нередко получают более многогранную картину, дающую объемную информацию для размышлений и постановки перспективных задач работы. По этой причине изложим лишь несколько примеров использования низкомолекулярных субстратов для изучения протеолиза, сосредоточивая большее внимание на приемах изучения расщепления белковых субстратов.

В литературе описаны многочисленные варианты одного и того же метода. В настоящей главе изложены методы изучения протеолиза, которые взяты из различных источников литературы и в свое время были хорошо проработаны в лаборатории биохимии НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Беларуси, а в настоящее время используются и дополняются в лаборатории регуляторных белков и пептидов Института физиологии НАН Беларуси.

В процессе многолетней работы обнаружено, что, например, в исследованиях расщепления фибринового геля предпочтительно использовать фосфатный буферный раствор. В последующем это подтвердилось и в работе с другими белками-субстратами. В итоге совокупность фактов вылилась в представления о «фосфатном эффекте» в протеолизе, суть которого детально изложена в [1, 2].

При выполнении исследований на фоне устранения данного феномена рекомендуется использовать методы лизиса фибриновых пластин или лизиса белков-субстратов в тонком слое агарового геля. Причем пластины субстрата следует готовить без использования солей неорганического ортофосфата.

В ряде случаев для изучения протеолиза требуется получение очищенных образцов протеиназ и зимогенов. Ниже приведены методы получения образцов плазминогена человека (Lys-формы) и тканевого активатора плазминогена.

5.2. Методы определения активности протеолитических ферментов

Существует несколько методических подходов для оценки активности протеолитических ферментов.

Определение активности протеиназ по расщеплению бензоил-аргинин-*p*-нитроанилида. *Принцип метода:* при расщеплении нитроанилидного субстрата высвобождается *p*-нитроанилин, количество которого определяют спектрофотометрически по величине абсорбции при 405 нм.

Реактивы:

- бензоил-аргинин-*p*-нитроанилид (BAPNa), 100 мМ раствор в диметилсульфоксиде (43,5 мг/мл);
- 0,1 М Tris-HCl-буфер, pH 8,0 (25 мл 0,4 М Tris-HCl-буфера – 1,21 г, смешивают с 55 мл 0,1 М раствора HCl и доводят дистиллированной водой до 100 мл);
- ЭДТА динатриевая соль, водный раствор, 0,93 мг/мл;
- *p*-нитроанилин;
- 50 %-ный водный раствор ТХУ.

Ход анализа: в две пробирки вносят по 2,91 мл Tris-HCl-буфера, 30 мкл раствора ЭДТА, 30 мкл BAPNa. Затем в опытную пробирку вносят 30 мкл раствора энзима и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин – 12 ч (это зависит от активности исследуемого материала; время инкубации необходимо определить в предварительном эксперименте) и измеряют величину абсорбции при 405 нм. В контрольную пробирку вносят 30 мкл дистиллированной воды и также измеряют величину абсорбции (контроль за спонтанным гидролизом субстрата). Из изменений величины абсорбции опытной пробы вычитают таковую контрольной пробы. Если растворы абсолютно прозрачны (например, исследуют очищенные энзимы), проводить измерения можно без добавления ТХУ.

Активность выражают в микромолях расщепленного субстрата в единицу времени. Строят калибровочный график по *p*-нитроанилину, для чего готовят серию растворов нитроанилина, содержащих от 25 до 250 нм реактива в объеме 3 мл.

Для расчета можно использовать коэффициент молярной экстинкции *p*-нитроанилина при 405 нм, который равен $10,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Расщепление BAPNa использовано также в комплексном методе определения активности трипсиноподобных протеиназ и белков-ингибиторов протеиназ в плазме крови [3].

Если же активность исследуют в мутных образцах, например гомогенатах ткани, то по истечении срока инкубации реакцию останавливают добавлением 0,3 мл 50 %-ного раствора ТХУ. Образующийся осадок удаляют центрифугированием при 8000 об/мин в течение 30 мин. В контрольные пробы анализируемый раствор энзима вводят в инкубационную смесь после добавления раствора ТХУ.

Определение активности плазмина по расщеплению хромогенного субстрата. Принцип метода: при расщеплении нитроанилидного субстрата высвобождается *p*-нитроанилин, количество которого определяют спектрофотометрически по величине абсорбции при 405 нм [4].

Реактивы:

- H-D-Val-Leu-Lys-pNa · 2HCl (S-2251);
- 0,1 М Tris-HCl-буфер, pH 7,4;
- 50 %-ный водный раствор ледяной уксусной кислоты.

Ход анализа: в две пробирки вносят по 0,1 мл раствора S-2251, по 2,5 мл 0,1 М Tris-HCl-буфера. Затем в опытную пробирку добавляют исследуемый образец – 0,4 мл (0,8 мг/мл плазмина), обе пробирки инкубируют при температуре 37 °С в течение 3 мин, добавляют по 0,5 мл 50 %-ного раствора уксусной кислоты и учитывают оптическую плотность при 405 нм против контрольной пробы, куда исследуемый образец вносят после уксусной кислоты.

В очищенных образцах плазминогена этот метод позволяет определять менее чем 0,1 % плазминовой активности.

Определение активности урокиназы по расщеплению хромогенного субстрата. Принцип метода: тот же, что при определении активности плазмина. При этом используют хромогенный субстрат, специфичный для урокиназы.

Реактивы:

- Bz-Ala-Gly-Arg-4pNa (Chromozym U), M_r 586,6;
- 0,05 М Tris-HCl-буфер, pH 7,4;
- 10 %-ный водный раствор лимонной кислоты.

Ход анализа: в две пробирки вносят по 1,6 мл 0,05 М Tris-HCl-буфера, pH 7,4 и по 0,2 мл раствора субстрата (100 мкМ).

В опытную пробирку добавляют 0,2 мл раствора исследуемого образца, а в контрольную – 0,2 мл буфера. Перемешивают содержимое пробирок и инкубируют при температуре 37 °С в течение 3–30 мин (это зависит от активности исследуемого материала; время инкубации необходимо определить в предварительном эксперименте). Затем добавляют по 0,5 мл раствора лимонной кислоты. Измеряют величину абсорбции опытной пробы против контрольной при 405 нм.

Активность энзима выражают в Е/мл (U/ml) и рассчитывают по формуле

$$\text{Ед/мл} = \frac{V}{v \cdot \epsilon_{405} \cdot d} \cdot \Delta A / \text{мин},$$

где V – объем смеси; v – объем образца (0,2 мл); ϵ_{405} – коэффициент абсорбции *p*-нитроанилина, $\epsilon_{405} = 10,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; d – длина оптического пути (1 см); $\Delta A / \text{мин}$ – изменения абсорбции в минуту.

Определение активности протеиназ по накоплению продуктов расщепления белков-субстратов. *Принцип метода:* метод основан на образовании в процессе расщепления белков протеиназами неосаждаемых ТХУ продуктов, концентрацию которых можно учесть по абсорбции при 280 нм (тирозинсодержащие пептиды) или уровню азота аминокислот [5].

Реактивы:

- белки-субстраты (казеин по Гаммерстену, гемоглобин, фибриноген, желатин, сывороточный альбумин, протамин-сульфат и др.). В качестве белка-субстрата можно применять любые водорастворимые белки. Однако при использовании сывороточного альбумина допустимы лишь образцы, не содержащие жирных кислот и свободные от примесей протеиназ, поскольку и те и другие существенно искажают результаты анализа. При реализации этого метода казеин в качестве субстрата можно использовать в нейтральной и щелочной зонах рН, но не в кислой, так как в кислой среде казеин выпадает в осадок;

- буферные растворы в зависимости от цели исследования: 0,2 М ацетатный буфер, рН 5,0, или 0,05 М Tris-HCl-буфер, рН 7,0, или 0,06 М калий-натрий фосфатный буфер, рН 7,0, или 0,7 М буфер бура-NaOH, рН 11,0, или другой необходимый для анализа;

- трихлоруксусная кислота, 5 %-ный водный раствор (хранят в холодильнике);
- DL- или L-тирозин.

Приготовление субстратного раствора казеина приведем отдельно, поскольку это сопряжено с некоторыми сложностями: 0,5 г казеина по Гаммерстену вносят в колбу, приливают 40 мл фосфатного буфера и 0,8 мл 1 М раствора NaOH. Выдерживают при перемешивании 40 мин, а затем помещают в кипящую водяную баню до полного растворения казеина. Затем содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и осторожно при перемешивании доводят pH раствора казеина с помощью 1 М раствора HCl до 7,4. Объем полученного раствора белка доводят буфером до 50 мл. Раствор казеина хранят в замороженном состоянии при температуре -20°C .

Приготовление стандартного раствора тирозина: в мерную колбу на 50 мл вносят 90,6 мг тирозина, 30 мл дистиллированной воды и по каплям – 1 М раствор NaOH при взбалтывании содержимого колбы до полного растворения тирозина. Затем доводят объем дистиллированной водой до 50 мл. Это – маточный раствор, содержащий 10 мкмоль/мл тирозина. Его разводят дистиллированной водой в 10 раз. Затем готовят образцы для калибровочного графика с содержанием тирозина в пробе от 0,1 до 4,0 мкМ в пробе при общем объеме каждой пробы 4,2 мл.

Ход анализа: в центрифужную пробирку вносят 1 мл 1 %-ного раствора белкового субстрата (в 0,2 М ацетатном буфере, pH 5,0, или 0,05 М Tris-HCl-буфере, pH 7,0, или 0,06 М калий-натрий фосфатном буфере, pH 7,0, или 0,7 М буфере бура-NaOH, pH 11,0, или другом необходимом для анализа буферном растворе), а также исследуемый образец – 0,2 мл. Смесь инкубируют при температуре 37°C в течение 1 ч, реакцию останавливают добавлением 3 мл охлажденной 5 %-ной ТХУ. Затем содержимое пробирки центрифугируют в течение 20 мин при 9000 об/мин.

Контрольные пробы инкубируют без исследуемого образца, последний вносят перед добавлением ТХУ. Содержание кислоторастворимого тирозина рассчитывают по калибровочному графику. Активность протеиназы выражают в микромолях кислоторастворимого тирозина, образующегося за 1 ч в пересчете на единицу объема или концентрации белка в исследуемом образце.

Если же в качестве субстрата используют белки, не содержащие триптофана и тирозина, то после центрифугирования в супернатанте определяют концентрацию образовавшихся пептидов по реакции с нингидрином.

Определение содержания азота аминокислот с нингидриновым реактивом. *Принцип метода:* метод основан на измерении интенсивности окраски, образующейся при взаимодействии нингидрина с альфа-аминокислотами. При восстановлении красно-желтая окраска переходит в фиолетово-синюю [6].

Реактивы: все работы по определению содержания аминного азота выполняются с использованием воды, не содержащей аммиака:

- нингидриновый реактив;
- 4 н ацетатный буфер, рН 4,54;
- 1 %-ный раствор аскорбиновой кислоты;
- уксусная кислота разведенная;
- стандартный раствор глицина.

Приготовление нингидринового реактива: 1,2 г нингидрина («х.ч.» или перекристаллизованного) растворяют в 15 мл н-пропанола (раствор № 1); 30 мл н-бутанола смешивают с 60 мл этиленгликоля и добавляют 9 мл 4 н ацетатного буфера, рН 4,54 (раствор № 2). Смешивают растворы № 1 и № 2. Реактив хранят в темной посуде. Срок годности – 30 дней.

В случае загрязнения спиртов или использования старых реактивов их предварительно перегоняют – н-пропанол при температуре 97,2, н-бутанол – при температуре 117,7 и этиленгликоль – при температуре 197,2 °С.

Приготовление ацетатного буфера: 54,4 г $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Полученный раствор кипятят в термоустойчивой посуде на электроплитке до уменьшения объема вдвое. После охлаждения полученный раствор переносят в мерную колбу на 100 мл, приливают 30 мл ледяной уксусной кислоты и доводят общий объем водой до метки. Проверяют рН на рН-метре (должен соответствовать 4,54), хранят в сосуде с притертой пробкой.

Приготовление разбавленной уксусной кислоты: 4 мл ледяной CH_3COOH растворяют в 1,75 л дистиллированной воды.

Приготовление стандартного раствора глицина: 535,6 мг глицина растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе

на 1 л и доводят объем до метки. Полученный маточный раствор разводят дистиллированной водой в 10 раз. Получают раствор с концентрацией аминного азота 50 мкг/мл.

Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора готовят 7 рабочих растворов с содержанием аминного азота от 5 до 35 мкг/мл с интервалом в 5 мкг. Затем в ряд пробирок вносят по 2 мл каждого из растворов, 3 мл нингидринового реактива и 0,1 мл 1 %-ного раствора аскорбиновой кислоты. Перемешивают и выдерживают на кипящей водяной бане 15 мин. Охлаждают и измеряют оптическую плотность при длине волны 580 нм в кюветах с толщиной слоя 0,5 см. В качестве контроля используют пробу, в которую вместо стандартного раствора глицина вносят 2 мл воды.

Ход анализа: в центрифужную пробирку вносят 2 мл разведенной уксусной кислоты и 2 мл исследуемого образца, предварительно разведенного (степень разведения следует выяснить в предварительном опыте) дистиллированной водой. Пробирку помещают в холодную водяную баню. Баню доводят до кипения, после чего пробу выдерживают 5 мин. Затем пробу охлаждают и центрифугируют при 1500–3000 об/мин в течение 15 мин; 2 мл прозрачной надосадочной жидкости переносят в сухую пробирку. При необходимости (высокое содержание АК) надосадочную жидкость разводят в 20 или 100 раз. Приливают 3 мл нингидринового реактива, 0,1 мл 1 %-ного раствора аскорбиновой кислоты и перемешивают. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 15 мин, а затем охлаждают на воздухе. Оптическую плотность растворов измеряют, как указано выше.

Измерения ведут против контрольной пробы, которая представляет собой 2 мл воды, обработанной так же, как образец питательной среды. Концентрацию аминного азота в пробе находят по калибровочному графику. Содержание аминного азота в образце рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot K_1 \cdot A}{2},$$

где X – количество аминного азота в 1 мл исходного образца, мг; C – концентрация аминного азота в пробе, мкг; K_1 – коэффициент пересчета разведения супернатанта; A – коэффициент пересчета разведения исходной среды; 2 – коэффи-

циент пересчета содержания аминного азота на 1 мл исходной среды.

Существует ряд случаев, когда в реакционную смесь при инкубации белка-субстрата с источником протеиназы вносится и исследуемый эффектор, который по своим свойствам мешает после осаждения нерасщепленного белка ТХУ измерению абсорбции при 280 нм или реакции с нингидрином. В такой ситуации целесообразно вести учет не по образованию продуктов расщепления субстрата – белка, а по непрореагировавшему субстрату, т.е. нерасщепленному белку. В этой ситуации после осаждения нерасщепленного белка в контроле и опыте и отделения осадков центрифугированием их растворяют в щелочи и определяют содержание белка хорошо известным и распространенным методом М.М. Брэдфорд [7]. Этот метод за последние десятилетия получил широкое распространение.

Определение азота пептидных фракций по методу Горбан. *Принцип метода:* метод основан на различной осаждаемости фракций белков и различающихся по молекулярной массе пептидов ТХУ различной концентрации и фосфорно-молибденовой кислотой. В полученных осадках затем определяют содержание общего азота [8].

Реактивы:

- ТХУ: 6 %-ный водный раствор, 17 %-ный, 2 %-ный, 8 %-ный;
- фосфорно-молибденовая кислота, 1 %-ный водный раствор;
- калия гидроксид, 1 М раствор.

Ход анализа: к 5 мл исследуемого образца приливают 5 мл 6 %-ного раствора ТХУ и центрифугируют смесь при 6000 об/мин в течение 30 мин. Образуется осадок, содержащий фракцию белков.

Сливают надосадочную жидкость. К 4 мл надосадочной жидкости, перенесенной в чистую пробирку, приливают 4 мл 17 %-ного раствора ТХУ и вновь центрифугируют при 6000 об/мин в течение 30 мин. Получают осадок фракции высокомолекулярных пептидов.

Сливают надосадочную жидкость, 2 мл переносят в чистую центрифужную пробирку, приливают 2 мл 1 %-ного раствора фосфорно-молибденовой кислоты и центрифугируют при условиях, указанных выше. При этом осаждается фракция пептидов средней молекулярной массы.

В полученной надосадочной жидкости находятся низкомолекулярные пептиды, АК и гетероциклические соединения. Осадки, полученные при первом и втором фракционировании, промывают небольшим количеством соответственно 2 %-ного или 8 %-ного раствора ТХУ, а осадок после третьего фракционирования – 1 %-ного раствора фосфорно-молибденовой кислоты.

Полученные осадки растворяют в 1 мл 1 М раствора КОН и переносят в колбы Кьельдаля для сжигания. Из надосадочной жидкости после третьего фракционирования отбирают 1 мл и также переносят в колбу Кьельдаля. Минерализацию, колориметрическое определение азота проводят так же, как при определении общего азота реактивом Несслера. Количество азота в пробах находят по калибровочному графику, а его количество во фракциях рассчитывают по следующим формулам:

$$X_1 = \frac{a_1}{5};$$

$$X_2 = \frac{a_2 \cdot 2,5}{5};$$

$$X_3 = \frac{a_3 \cdot 4 \cdot 2,5}{5};$$

$$X_4 = \frac{a_4 \cdot 4 \cdot 4 \cdot 2,5}{5},$$

где X_1, X_2, X_3, X_4 – количество азота соответственно белков, среднемолекулярных, высокомолекулярных, низкомолекулярных пептидных фракций в 1 мл исследуемого образца; a_1, a_2, a_3, a_4 – концентрация азота в указанных фракциях; 2,5 – коэффициент пересчета на объем первой надосадочной жидкости; 4 – коэффициент пересчета на объемы второй и третьей надосадочной жидкости; 5 – коэффициент пересчета на 1 мл образца.

Определение общего азота с реактивом Несслера. Принцип метода: метод основан на способности ионов аммония давать интенсивное красно-желтое окрашивание с реактивом Несслера, которое обусловлено образованием комплексного соединения ртути.

Реактивы:

- кислота серная концентрированная, «х.ч.»;

- натрия гидроксид, 10 %-ный водный раствор;
- реактив Несслера (10 г HgI_2 растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в ступке и переливают в склянку из темного стекла. Затем туда добавляют 5 г KI . В оставшейся от объема 100 мл дистиллированной воде растворяют 20 г NaOH , охлаждают и переливают в склянку. Реактив выдерживают в течение недели для осаждения избытка солей ртути, а над осадком образуется прозрачная светло-желтая жидкость. Ее осторожно сливают в склянку из темного стекла); можно пользоваться готовым реактивом Несслера;
- сульфат аммония, «х.ч.»;
- H_2O_2 , 30 %-ный раствор.

Приготовление стандартного раствора сульфата аммония: 237,6 мг сульфата аммония растворяют в мерной колбе на 1 л и доводят объем дистиллированной водой до метки. Содержание азота в таком растворе составляет 50 мкг/мл.

Построение калибровочного графика: из стандартного раствора готовят 10 рабочих растворов с концентрацией азота от 2 до 20 мкг/мл с интервалом 2 мкг/мл. В ряд пробирок вносят по 1 мл каждого из растворов, приливают по 8 мл дистиллированной воды, 1 мл 10 %-ного раствора NaOH и по 1 мл реактива Несслера. После перемешивания содержимого пробирок измеряют оптическую плотность при длине волны 453 нм. Контролем служит проба, в которую вместо раствора сульфата аммония внесен 1 мл дистиллированной воды. Калибровочную кривую строят, откладывая по оси ординат показания колориметра, а по оси абсцисс – концентрацию азота в пробе.

Ход анализа: в колбу Кьельдаля вносят 1 мл исследуемого образца, предварительно разведенного дистиллированной водой (степень разведения зависит от концентрации исследуемого материала, кратность разведения следует определить опытным путем). Приливают 1 мл концентрированной H_2SO_4 и нагревают смесь на электроплитке до испарения воды. Колбу охлаждают на воздухе и вносят 2–3 капли H_2O_2 .

Минерализацию продолжают до полного обесцвечивания смеси. Колбу охлаждают, содержимое количественно переносят в мерную пробирку на 10 мл, смывая колбу несколько раз дистиллированной водой. Доводят объем дистиллированной водой до 10 мл. Затем 1 мл полученного раствора переносят в чистую пробирку, добавляют 8 мл H_2O и 1 мл

10 %-ного раствора NaOH, а затем – 1 мл реактива Несслера. Перемешивают содержимое и измеряют оптическую плотность при длине волны 453 нм, используя в качестве контроля смесь из 9 мл H₂O, 1 мл 10 %-ного раствора NaOH и 1 мл реактива Несслера.

Содержание азота в пробе определяют по калибровочному графику. Количество общего азота в образце находят по формуле

$$X = a \cdot B,$$

где X – количество общего азота в 1 мл образца; a – количество азота в пробе; B – коэффициент пересчета разведения.

Определение активности стрептокиназы методом серийных разведений. *Принцип метода:* стрептокиназа, вызывая активацию прочносвязанного с фибриногеном человека плазминогена в активную протеиназу плазмин, инициирует таким образом растворение фибринового сгустка, образуемого в реакционной смеси при действии тромбина на фибриноген [9].

Реактивы:

- 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4 (использование Tris-HCl или карбонатных буферов нежелательно);
- фибриноген человека «М» лиофильно сухой;
- тромбин человека лиофильно сухой;
- международный стандарт ВОЗ «стрептокиназа-стрептодорназа».

Ход анализа: в ряд пробирок, начиная со второй, вносят по 0,2 мл фосфатного буфера. Затем в первую и вторую пробирки добавляют по 0,2 мл исследуемого образца. Содержимое второй пробирки перемешивают повторным пипетированием, отбирают 0,2 мл смеси и переносят в третью пробирку. Повторяют процедуру перемешивания и 0,2 мл смеси переносят в следующую пробирку и т.д.

Таким образом получают ряд серийных разведений исследуемого образца (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 и т.д.). Затем во все пробирки, содержащие по 0,2 мл каждого из разведений, вносят по 0,1 мл раствора тромбина (30 ед/мл) в 0,9 %-ном растворе NaCl и по 1,0 мл раствора 0,1 %-ного раствора фибриногена в указанном фосфатном буфере. Пробирки инкубируют при температуре 37 °С, учитывая разведение, при котором лизис

образующегося фибринового сгустка полностью завершается за 30 мин.

В отдельную пробирку (контроль) вносят фосфатный буфер, растворы тромбина и фибриногена. Образующийся фибриновый сгусток не должен распадаться в процессе инкубации при температуре 37 °С и после завершения ее в течение 2 ч.

Следует обращать внимание на характер образующихся фибриновых сгустков. Они должны быть плотными, «стекло-видными». Это свидетельствует о хорошем качестве фибриногена.

Поскольку активность стрептокиназы принято выражать в международных единицах (МЕ/мл), готовят также разведения и международного стандарта, проводят в дальнейшем сопоставление результатов определения активности исследуемого и стандартного образцов.

Определение плазминоген-активаторной способности активаторов плазминогена или прямой фибринолитической активности методом лизиса фибриновых пластин. *Принцип метода:* активаторы плазминогена активируют прочносвязанный с фибриногеном плазминоген, переводя его в активную протеиназу плазмин, который расщепляет пленку предобразованного геля фибрина, образуя зоны лизиса, размер которых соответствует активности испытуемого образца.

Реактивы:

- 0,06 М фосфатный буфер, рН 7,4;
- фибриноген человека «М» лиофильно сухой;
- тромбин человека лиофильно сухой.

Для исследования активаторной функции той же стрептокиназы при воздействии на нее различных факторов целесообразно использовать фибринолитический метод Т. Аструпа – С. Мюлерца [10, 11], предложенный ими для активаторов, заключающийся в лизисе фибриновой пластины образующимся плазмином.

Характерной особенностью данной модели является то, что активатор плазминогена (стрептокиназа или иной) вносится в систему уже после формирования фибринового геля. Это полностью выключает действие на активацию плазминогена реакций фибринообразования и влияние на последние продуктов гидролиза плазмином фибриногена, а также и непосредственно самого плазмينا.

Более того, использование модели с предобразованным фибриновым гелем позволяет резко уменьшить влияние раз-

личных факторов на иницируемый стрептокиназой фибринолиз через фибринообразование.

Ход анализа: фибриновую пластину готовят следующим образом. Фибриноген растворяют в 0,06 М фосфатном буфере, рН 7,4, а тромбин – в 0,15 М растворе NaCl или в дистиллированной воде.

В одну пробирку вносят 9,0 мл раствора человеческого фибриногена (3 мг белка/мл), а в другую – 0,2 мл раствора тромбина (100 ед/мл).

На строго горизонтальной поверхности (для этого нужно поместить в определенное место рабочего стола эмалированную кювету и залить ее расплавленным парафином, уровень которого установится строго горизонтально; после застывания на поверхность парафина следует положить лист стекла подходящего размера, что предотвратит погружение чашек Петри в парафин в случае значительного количества таковых и необходимости размещения их в 2–3 яруса (это особенно важно при термостатировании чашек); кювету с застывшим парафином нельзя перемещать в другое место) помещают чашку Петри (не имеющую дефектов дна), быстро смешивают содержимое двух пробирок, повторно переливая содержимое первой во вторую, а затем – содержимое второй в первую, и выливают в чашку Петри.

Чашку закрывают верхней половиной, в которую помещают диск фильтровальной бумаги (обязательно!). После образования геля пластины выдерживают 1 ч при комнатной температуре. Затем на поверхность геля наносят по 10 мкл исследуемых образцов (на одну пластину, в зависимости от активности исследуемых образцов, можно нанести 4–6 образцов), инкубируют пластины в термостате при температуре 37 °С в течение 20 ч на строго горизонтальной поверхности и учитывают площадь зон лизиса в квадратных миллиметрах. В этих целях проецировали зоны лизиса при подсветке лампой на миллиметровую бумагу и находили площадь путем взвешивания бумажных дисков на аналитических весах.

Обычно метод Аструпа – Мюллерца не привлекает исследователей из-за значительного разброса результатов в параллельных определениях – некоторые авторы наблюдали колебания в параллельных определениях не менее 20 %.

В специальных опытах нами было установлено, что введение трех довольно простых приемов (подбор чашек без де-

фектов дна, приготовление и инкубация пластин на горизонтальной поверхности, учет площади зон лизиса по проекции вместо рекомендуемого произведения диаметров, пересекающихся под углом 90° (Т. Аструп и др., 1971)) позволило свести различия в параллельных определениях до 7 %. При соблюдении вышеуказанных условий, хорошей технике исполнения и некотором навыке зоны лизиса получаются практически идеально округлыми. Кроме того, есть еще одна важная деталь. Новые чашки Петри следует обработать хромовой смесью и тщательно выполоскать водопроводной и дистиллированной водой.

Использованные в подобных анализах чашки следует механически очистить от геля, вымыть с применением соды или моющих средств, после чего тщательно сполоснуть 0,1 М раствором HCl и вымыть водопроводной и дистиллированной водой. Чашки можно кипятить в дистиллированной воде, использование при этом моющих средств недопустимо.

В случаях когда необходимо исследовать активность образцов плазмина или плазминогена, активированного стрептокиназой или другими активаторами, следует использовать пластины фибрина после предварительной инактивации содержащегося в них собственного плазминогена. Наиболее широко для этой цели применяется прогревание пластин в узком диапазоне температуры: $86-90^\circ\text{C}$.

Данный прием, однако, имеет существенный недостаток: при нагревании происходит испарение жидкой фазы, дегидратация геля. Как показали специальные исследования, при термоинактивации теряется около 15 % жидкой фазы, что приводит к изменению свойств геля, зоны лизиса получаются с рваными краями, гель растрескивается. В итоге точность определения снижается. Поэтому для инактивации собственного плазминогена фибриновых пластин нами было предложено облучение их жесткими УФ-лучами при комнатной температуре, например лампой ПРК-4 (мощность излучения 18 Вт), в течение 10–30 мин на расстоянии 35–45 см [12].

Указанный прием полностью уничтожает плазминоген, но не вызывает дегидратации геля фибрина. В итоге зоны лизиса получают правильной формы с ровными краями, что повышает точность исследований.

Данный метод может быть использован при исследовании фибринолитической активности любых протеиназ. Адекватность подобного метода проверена на примере рН-зависимости расщепления фибринового геля пепсином свиньи. Для этого фибриновый гель приготовили не на фосфатном буфере, а на 0,15 М растворе хлорида натрия. Величину рН аликвот раствора пепсина достигали, используя 0,1 М раствор HCl или 0,2 М ацетатный буфер. Полученная рН-зависимость расщепления пепсином фибринового геля (рис. 5.1) хорошо согласуется с данными литературы о рН-оптимуме лизиса белков пепсином.

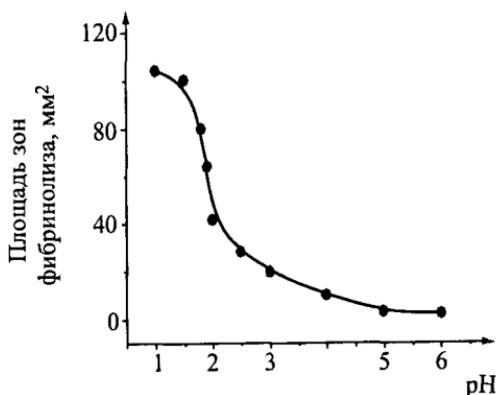


Рис. 5.1. Зависимость фибринолитической активности пепсина свиньи от рН растворителя

Определение расщепления белков-субстратов протеиназами методом лизиса белков в тонком слое агарового геля. *Принцип метода:* принцип аналогичен таковому при использовании фибриновых пластин. Однако в данном случае субстратом служат водорастворимые белки, гомогенное распределение которых обеспечивается агаровым гелем. Это позволяет вести исследования и при экстремальных величинах рН или в присутствии тех реагентов, которые вызывают выпадение белков из раствора в осадок.

Реактивы:

- бактоагар типа «Difco»;
- белки-субстраты (казеин по Гаммерстону, гемоглобин, фибриноген, желатин, сывороточный альбумин, протамина-сульфат и др.).

В качестве белка-субстрата можно использовать любые водорастворимые белки. Однако при использовании сывороточного альбумина допустимы лишь образцы, не содержащие жирных кислот и свободные от примесей протеиназ, поскольку и те и другие существенно искажают результаты анализа. При работе этим методом казеин в качестве субстрата можно применять в нейтральной и щелочной зонах pH, но не в кислой, так как в кислой среде казеин выпадает в осадок;

- буферные растворы в зависимости от цели исследования: 0,2 М ацетатный буфер, pH 5,0, или 0,05 М Tris-HCl буфер, pH 7,0, или 0,06 М калий-натрий фосфатный буфер, pH 7,0, или 0,7 М буфер бура-NaOH, pH 11,0, или другой необходимый для анализа;

- хлорная кислота HClO₄, 1 М водный раствор.

Приготовление белок-агаровых пластин требует соблюдения тех же условий, что и при приготовлении фибриновых пластин (горизонтальная поверхность, качество чашек Петри, характер их подготовки, диск фильтровальной бумаги в верхней половине чашки).

Для получения каждой пластины в одной пробирке навеску 100 мг агара растворяют в 5 мл соответствующего буферного раствора на кипящей водяной бане до полного растворения.

Во второй пробирке навеску 100 мг белка-субстрата растворяют в 5 мл соответствующего буферного раствора, если необходимо – при нагревании.

Полученный расплавленный агар следует охладить до температуры приблизительно 60 °С, быстро смешать с раствором белка и вылить смесь в чашку Петри на горизонтальной поверхности.

После остывания белок-агаровой пластины чашку закрывают верхней половиной, в которую помещают диск фильтровальной бумаги (обязательно!).

Ход анализа: на поверхность геля наносят по 10 мкл исследуемых образцов (на одну пластину в зависимости от активности исследуемых образцов можно нанести 4–6 образцов), инкубируют пластины в термостате при температуре 37 °С в течение 20 ч на строго горизонтальной поверхности. Для визуализации зон лизиса белок-агаровые пластины обрабатывают раствором хлорной кислоты и учитывают площадь зон лизиса в квадратных миллиметрах.

Определение активности плазминогена по лизису казеина. *Принцип метода:* под действием стрептокиназы плазми-

ноген быстро превращается в активную протеиназу – плазмин, которая расщепляет казеин с образованием кислоторастворимых продуктов, содержащих остатки тирозина. Количество кислоторастворимого тирозина учитывают спектрофотометрически.

Реактивы:

- казеин по Гаммерстену;
- 0,1 М калий-натрий фосфатный буфер, pH 7,4;
- стрептокиназа (раствор в 0,15 М растворе NaCl, содержащий 1250 МЕ/мл стрептокиназы);
- 15 %-ный водный раствор ТХУ;
- DL- или L-тирозин.

Ход анализа: в две центрифужные пробирки вносят по 1,0 мл 4 %-ного раствора казеина в фосфатном буфере, по 1,0 мл раствора исследуемого образца в том же буфере. Затем в опытную пробирку вносят 0,2 мл раствора стрептокиназы и 0,8 мл фосфатного буфера, а в контрольную – 1,0 мл фосфатного буфера.

Тщательно перемешивают содержимое пробирок и инкубируют их при температуре 37 °С в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Затем в обе пробирки добавляют по 3,0 мл раствора ТХУ. Через 15 мин содержимое пробирок центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин, измеряют величину абсорбции прозрачного супернатанта опытной пробирки против такового контрольной при 280 нм.

Количество кислоторастворимого тирозина в пробе находят по калибровочному графику.

За одну казеинолитическую единицу принимают активность, при которой из казеина на 1 мл исследуемого образца на 1 ч образуются 450 мкг кислоторастворимого тирозина.

Определение активности Ca^{2+} -активируемых протеиназ (кальпаинов). *Принцип метода:* метод аналогичен тому, который описан ранее для определения активности протеиназ по расщеплению белков-субстратов [13].

Реактивы:

- казеин по Гаммерстену, готовят 0,2 %-ный раствор, как описано выше;
- 0,1 М Tris-HCl-буфер, pH 7,2;
- водные растворы CaCl_2 с концентрацией 50 мкМ (для кальпаина I) и 5 мМ (для кальпаина II);
- 10 %-ный раствор хлорной кислоты (хранят в холодильнике);

- DL- или L-тирозин (приготовление стандартного раствора и построение калибровочного графика описано выше).

Ход анализа: в центрифужные пробирки вносят по 0,1 мл 0,2 %-ного раствора казеина; 0,1 мл Tris-HCl-буфера, pH 7,2; 0,1 мл раствора хлористого кальция (в концентрации 50 мкМ для кальпаина I или 5 мМ для кальпаина II). В опытные пробирки вносят 0,1 мл исследуемого образца, перемешивают содержимое пробирок и инкубируют их при температуре 37 °С в течение 2 ч.

Реакцию останавливают добавлением охлажденной 10 %-ной HClO₄. Контролем при определении протеолитической активности служат пробы, в которые HClO₄ вносят сразу же после смешивания компонентов инкубационной смеси.

Расчет активности ведут аналогично описанному выше способу по калибровочному графику.

Определение активности АТФ-активируемых протеиназ. Принцип метода: метод аналогичен тому, который описан ранее для определения активности протеиназ по расщеплению белков-субстратов [14].

Реактивы:

- казеин по Гаммерстону, готовят 0,3 %-ный раствор, как описано выше;

- 0,1 М Tris-HCl-буфер, pH 9,0;

- водный раствор АТФ-динатриевой соли с концентрацией 0,3 мМ;

- 10 %-ный раствор хлорной кислоты (хранят в холодильнике);

- DL- или L-тирозин (приготовление стандартного раствора и построение калибровочного графика описаны выше).

Ход анализа: в центрифужные пробирки вносят по 0,1 мл 0,3 %-ного раствора казеина; 0,1 мл Tris-HCl-буфера, pH 7,2; 0,1 мл раствора АТФ-динатриевой соли. В опытные пробирки вносят 0,1 мл исследуемого образца, перемешивают содержимое пробирок и инкубируют их при температуре 37 °С в течение 60 мин.

Реакцию останавливают добавлением охлажденной 10 %-ной HClO₄. Контролем при определении протеолитической активности служили пробы, в которые HClO₄ вносили сразу же после смешивания компонентов инкубационной смеси.

Расчет активности ведут аналогично описанному выше способу по калибровочному графику.

5.3. Препаративные методы при анализе протеолитической активности

Оценка *протеолитической активности* некоторых биологических образцов требует дополнительных препаративных операций и приемов.

Получение Lys-сефарозы из BrCN-сефарозы 4B.

Реактивы:

- BrCN-сефароза 4B;
- 0,001 н раствор HCl;
- 0,1 М бикарбонатный буфер, pH 9,0 (2,1 г NaHCO_3 растворяют в 250 мл дистиллированной воды, добавляют 0,5 М (7,3 г) NaCl и доводят pH раствором Na_2CO_3 произвольной концентрации);
- 0,1 М бикарбонатный буфер, pH 9,0, содержащий 1 М NaCl;
- 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,0, содержащий 1М NaCl;
- 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4;
- L- или DL-лизин гидрохлорид.

Ход работы: навеску 5,5 г BrCN-сефарозы 4B (1 г такой сефарозы дает 3,5 мл геля) промывают 500 мл 0,001 М раствором HCl на фильтре Шотта. Затем гель переносят в бикарбонатный буфер и доводят pH до 8,9.

После доведения pH к полученной взвеси сефарозы добавляют 2 г L- или DL-лизина гидрохлорида и вновь доводят pH до 8,6–8,7. Смесь оставляют при комнатной температуре на 2 ч, периодически перемешивая (магнитная мешалка недопустима!). Повторно добавляют еще 1,5 г L- или DL-лизина гидрохлорида и оставляют на ночь. Общий объем смеси с буфером составляет 140 мл.

Гель последовательно промывают избытком охлажденной дистиллированной воды, бикарбонатным буфером (содержащим 1 М NaCl), 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,0 (содержащим 1М NaCl), вновь бикарбонатным буфером (содержащим 1 М NaCl) и 0,1 М ацетатным буфером, pH 4,0 (содержащим 1 М NaCl), и, наконец, 0,06 М фосфатным буфером, pH 7,4. Полученный гель в буфере хранят в холодильнике.

Получение Lys-плазминогена человека методом аффинной хроматографии из отходов гамма-глобулинового производства. *Принцип метода:* водорастворимые белки обогащенного β -глобулинами осадка белков плазмы крови экстрагируют фосфатным буфером с полигликолями и наносят на

аффинный лизинсодержащий сорбент; балластные белки элюируют фосфатным буфером с нарастающей ионной силой, а специфическую элюцию плазминогена, взаимодействовавшего с лизином сорбента лизин-связывающими кринглами, проводят специфическим лигандом кринглов ϵ -аминокапроновой кислоты.

Реактивы:

- Lys-сефароза;
- ϵ -аминокапроновая кислота;
- полиэтиленгликоль-4000;
- полиэтиленгликоль-6000;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 8,1;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 7,6;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 8,1, содержащий 0,1 М NaCl;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 8,1, содержащий 0,2 М NaCl;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 8,1, содержащий 0,5 М NaCl;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 7,6, содержащий 0,2 М ϵ -аминокапроновой кислоты;
- 0,1 М Na-Na-фосфатный буфер, pH 8,1, содержащий азид натрия в концентрации 60 мг/л.

Ход работы: навеску обогащенного β -глобулинами осадка белков плазмы крови 5 г смешивают с 500 мг ПЭГ 4000 и 500 мг ПЭГ 6000, добавляют 20 мл 0,1 М Na-Na-фосфатного буфера, pH 8,1, содержащего 0,1 М NaCl. Ставят для перемешивания на магнитную мешалку на 2,5 ч, а затем – для дальнейшей экстракции в холодильник на ночь (без перемешивания). Прозрачную зеленоватого цвета надосадочную жидкость сливают в отдельный чистый стакан, а осадок суспензируют в 10 мл 0,1 М Na-Na-фосфатного буфера, pH 8,1, содержащего 0,1 М NaCl. Надосадочную жидкость и полученную центрифугируют в течение 1 ч при 9000 об/мин. Полученные супернатанты объединяют. При этом получают около 30 мл опалесцирующей жидкости.

Стекланную колонку (10 × 1 см) заполняют гелем Lys-сефарозы, помещают сверху геля кружок фильтровальной бумаги и промывают 50 мл 0,1 М Na-Na-фосфатного буфера, pH 8,1.

Медленно (приблизительно в течение 3 ч) наносят полученный опалесцирующий раствор белков на колонку. Промывают колонку фосфатным буфером до нулевой величины аб-

сорбции при 280 нм. На этой стадии колонку можно оставить до утра в холодильнике.

Затем проводят элюцию белковых примесей последовательно 0,1 М Na-Na-фосфатным буфером, рН 8,1, содержащим 0,2 М NaCl, этим же буфером, содержащим 0,5 М NaCl. Во всех случаях элюцию ведут до нулевой величины абсорбции при 280 нм.

Специфическую десорбцию плазминогена проводят 0,1 М Na-Na-фосфатным буфером, рН 7,6, содержащим 0,2 М ϵ -аминокапроновой кислоты. При этом регистрируют абсорбцию при 280 и 320 нм (мутность). Собирают фракции элюата объемом 2 мл. Фракции с величиной абсорбции при 280 нм выше 0,5 объединяют. Получают пул объемом около 6,5 мл. Объединенную фракцию помещают в диализный мешок и диализуют в течение 5 ч против дистиллированной воды, а затем в течение ночи против 0,1 М Na-Na-фосфатного буфера, рН 8,1. Объем пробы после диализа равен около 8 мл. Такой цикл позволяет получить 5,5–6,0 мг плазминогена.

Колонку с сорбентом промывают 50 мл 0,1 М Na-Na-фосфатного буфера, рН 8,1, меняют фильтровальную бумагу сверху и заполняют 10 мл 0,1 М Na-Na-фосфатным буфером, рН 8,1, содержащим азид натрия.

Полученный раствор плазминогена подвергают лиофильной сушке либо хранят в замороженном виде при температуре не выше -20°C . При этом пул плазминогена следует разлить в пробирки Эппендорфа по алликвотам и использовать в работе только необходимое количество. Нельзя подвергать раствор плазминогена повторному оттаиванию – замораживанию. В таком случае он преобразуется в плазмин.

Концентрацию плазминогена в растворе определяют, используя коэффициент абсорбции при 280 нм $A_{1\text{ см}}^{1\%} = 17,0$.

Получение плазмينا человека методом аффинной хроматографии. Плазмин человека выделяют, как и плазминоген, описанным выше методом. Для выделения используют сырье с исходно высоким содержанием активного плазмينا, что определяют методом лизиса фибриновых пластин.

Удельная активность полученных нами таким образом образцов соответствовала 25 казеинолитических единиц/мг белка.

Образцы были гомогенны при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в нере-

дуцирующих условиях, а после обработки 2-меркаптоэтанолом давали две полосы, соответствующие легкой и тяжелой цепям плазмينا.

Получение частично очищенного препарата тканевого активатора плазминогена из сердца свиньи. *Принцип метода:* белки из эфирно-ацетонового порошка ткани сердца экстрагируют слабым раствором соляной кислоты, осаждают в изоэлектрической точке, а затем дважды осаждают сульфатом аммония [13].

Реактивы:

- диэтиловый эфир;
- ацетон;
- 0,1 М раствор HCl;
- 0,01 М раствор HCl;
- 1 М раствор NaOH;
- насыщенный раствор сульфата аммония;
- 0,1 М калий-натрий фосфатный буфер, рН 7,4.

Ход работы: свежее (!) сердце свиньи очищают от остатков перикарда, аорты, жировых отложений и нарезают на куски. Промывают диэтиловым эфиром для обезжиривания.

Полученные куски пропускают через мясорубку, обрабатывают последовательно достаточным количеством ацетона и диэтилового эфира для обезвоживания. Просушивают массу в вытяжном шкафу, не нагревая ее. При этом будет образовываться воздушно-сухая масса серовато-белого цвета, легко растираемая в порошок.

Навеску порошка 4 г смешивают с 800 мл 0,1 М раствора HCl и оставляют на ночь для экстракции. Осадок отбрасывают, рН надосадочной жидкости доводят до 6,2 с помощью 1 М раствора NaOH. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок растворяют в 200 мл 0,01 М раствора HCl.

Затем добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до насыщения 54 %. Образующийся осадок отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 2000 об/мин, растворяют его в 100 мл дистиллированной воды. Величина рН после диализа – 6,2.

Повторно при рН 6,2 добавляют насыщенный раствор сульфата аммония до насыщения 54 %. Осадок отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 2000 об/мин. Вся

плазминоген-активаторная активность сосредоточена в осадке. Его растворяют в дистиллированной воде, помещают в диализный мешок и ставят на диализ против проточной, а затем против дистиллированной воды на 1 сут. Величина рН после диализа – 6,2. Полученный раствор тканевого активатора разливают в ампулы и высушивают лиофильно.

Следует отметить, что приведенные методы далеко не исчерпывают всего многообразия протеолитических энзимов, белков-ингибиторов протеиназ. Как уже указано выше, авторы сосредоточили внимание на тех приемах исследования протеолиза, которые были хорошо отработаны в ходе экспериментов. Однако даже к данным методическим приемам не следует относиться как к догме. Объектов исследования протеолиза чрезвычайно много, разнообразие их велико. Поэтому избранная экспериментатором методика при решении конкретной задачи должна быть предварительно хорошо отработана и для конкретного объекта изменена. Прежде всего это касается величины рН растворителя, его состава, присутствия эффекторов (авторы не останавливались специально на определении активности цистеиновых протеиназ, иных металлопротеиназ, кроме кальпаинов). Не затронуты также аспекты определения ингибиторов протеиназ, хотя с помощью изложенных в настоящей главе методов вполне можно решать и данные задачи.

В настоящее время в отечественной биологии, медицине, сельском хозяйстве и отдельных отраслях промышленности проблеме протеолиза уделяют весьма скромное внимание, хотя для решения целого ряда даже практических задач использование информации о его реакциях и компонентах просто необходимо. Это положение сохраняется, несмотря на неоднократно издаваемые ранее практические руководства, содержащие описание методов исследования протеолиза.

Литература

1. *Пыжова, Н.С.* Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // Биоорг. химия. 2008. Т. 34, № 3. С. 382–391.

2. *Никандров, В.Н.* Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и при-

кладное значение / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Новости медико-биол. наук. 2010. № 3. С. 14–28.

3. *Карягина, И.Ю.* Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ, α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И.Ю. Карягина, Р.А. Зарембский, М.Д. Балябина // Лаб. дело. 1990. № 2. С. 10–13.

4. *Андреевко, Г.В.* Методы исследования фибринолитической системы крови / Г.В. Андреевко [и др.]. М., 1981.

5. *Каверзнева, Е.Д.* Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз / Е.Д. Каверзнева // Прикл. биох. микроб. 1971. Т. 7, № 12. С. 225–228.

6. *Починок, Х.Н.* Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починков. Киев, 1976.

7. *Bradford, M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, N 1–2. P. 248–254.

8. *Торбан, М.А.* О механизме обезвреживания токсина формалином / М.А. Торбан // Биохимия. 1960. Т. 25, № 1. С. 28–33.

9. *Алексеева, В.Н.* Методические рекомендации по определению активности стрептокиназы / В.Н. Алексеева [и др.]. Л., 1985.

10. *Mullertz, S.* Formation and properties of the activation of plasminogen and of human and bovine plasmin / S. Mullertz // Biochem. J. 1955. Vol. 61. P. 424–434.

11. *Astrup, T.* Assay of plasminogen activator in tissues / T. Astrup [et al.] // Thromb. Bleeding Disorders. Theory and Methods. Stuttgart-NY-London. 1971. P. 370–375.

12. *Никандров, В.Н.* Способ определения активаторов плазминогена / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова. А.с. СССР № 1472508 от 15.12.1988.

13. *Андреевко, Г.В.* Метод выделения и изучение свойств тканевого активатора плазминогена (профибринолизина) / Г.В. Андреевко, Л.А. Мигалина // Биохимия. 1971. Т. 36, № 4. С. 685–689.

14. *Никандров, В.Н.* Изменения активности АТФ- и Ca^{2+} -зависимого протеолиза в клетках феохромоцитомы РС12, вызванные воздействием плазминогена и фактора роста нервов / В.Н. Никандров [и др.] // Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук. 2003. № 2. С. 54–58.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИЛОВИЕ	3
ГЛАВА 1. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОТБОРА КОМПОНЕНТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН	5
1.1. Схема отбора компонентов для синтетических вакцин	5
1.2. Определение основных направлений мутационного давления в вирусном гене	8
1.3. Выделение наиболее иммуногенных областей вирусного белка	14
1.4. Предсказание вторичной структуры для выделенных В-клеточных эпитопов	21
1.5. Оценка уровней мутабельности В-клеточных эпитопов вирусного белка	23
1.6. Оценка консервативности В-клеточных эпитопов вирусного белка	29
<i>Литература</i>	34
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ: КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МИНОРНОЙ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА A₂	34
2.1. Обзор методов кристаллизации белковых молекул	36
2.2. Стратегии кристаллизации белковых молекул	51
2.3. Получение кристаллов гемоглобина A ₂	55
<i>Литература</i>	64
ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ	65
3.1. Количественное определение белка	66
3.2. Общие правила работы с ферментами	75
3.3. Определение активности ферментов	77
3.4. Выделение и очистка ферментов	79
3.5. Частичная очистка растворимой НТФазы из почек быка ...	91
3.6. Исследование свойств ферментов	99
<i>Литература</i>	104

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ	104
4.1. Аналитические задачи, требующие аминокислотного анализа	104
4.2. Определение свободных аминокислот с помощью ионообменной хроматографии	107
4.3. Высокоэффективная ионно-обменная хроматография (ВЭЖХ)	117
<i>Литература</i>	131
ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИЗА	132
5.1. Биологическая роль протеолиза	133
5.2. Методы определения активности протеолитических ферментов	135
5.3. Препаративные методы при анализе протеолитической активности	152
<i>Литература</i>	156
ГЛАВА 6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ	158
6.1. Определение показателей, характеризующих активность свободнорадикальных процессов	159
6.2. Определение концентрации диеновых конъюгатов в микросомальной фракции печени крыс	163
6.3. Определение концентрации вторичных продуктов ПОЛ и скорости процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот с тиобарбитуровой кислотой	164
6.4. Определение скорости ПОЛ в микросомальной фракции печени крыс в присутствии прооксидантов	167
6.5. Оценка окислительной модификации белков	170
6.6. Определение показателей АОС	173
6.7. Метод определения антиоксидантной активности смесей веществ или биологических жидкостей с использованием микросомальной фракции печени крыс в качестве модельной системы окисления	193
<i>Литература</i>	195

ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ	196
7.1. Полярнографический метод	197
7.2. Исследование тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий	199
7.3. Преимущества изучения митохондриального окисления целой ткани	206
<i>Литература</i>	212
ГЛАВА 8. БИОХИМИЯ ДЫХАНИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА	213
8.1. Тканевой цилиндр Крома	213
8.2. Концепция конвективного механизма транспорта кислорода	217
8.3. Методы исследования осцилляторного массопереноса воды и кислорода	223
8.4. Математическое моделирование дыхания и оксигенации	226
8.5. Диффузионный и осцилляторный механизмы оксигенации	228
<i>Литература</i>	231
ГЛАВА 9. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ	232
9.1. Роль цикла трикарбонных кислот в обмене веществ	232
9.2. Методы определения активности ферментов ЦТК	234
9.3. Определение содержания субстратов ЦТК	249
<i>Литература</i>	254
ГЛАВА 10. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА	255
10.1. Биологическое значение гликолиза	255
10.2. Определение содержания некоторых субстратов гликолитического пути	258
10.3. Определение активности важнейших ферментов гликолитического пути	266
<i>Литература</i>	272

ГЛАВА 11. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ	273
11.1. Экстракция липидов из крови и тканей	273
11.2. Исследование состава липидов методом тонкослойной хроматографии	274
11.3. Количественное определение триглицеридов сыворотки крови	282
11.4. Качественный и количественный анализ высших жирных кислот методом газожидкостной хроматографии	284
<i>Литература</i>	292
ГЛАВА 12. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН	293
12.1. Микросомальные мембраны и метаболизм ксенобиотиков	293
12.2. Выделение микросом. Количественное определение цитохромов	298
12.3. Определение активности некоторых ферментов лекарственного метаболизма	299
12.4. Определение активности системы метаболизма ксенобиотиков в целом организме	302
12.5. Митохондриальные мембраны. Электрон-транспортная цепь митохондрий	305
12.6. Биохимический анализ мембран митохондрий	309
<i>Литература</i>	317
ГЛАВА 13. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ ФАГОЦИТОЗА	318
13.1. Выделение нейтрофилов крови человека	320
13.2. Определение жизнеспособности клеток	322
13.3. Исследование генерации АФК	326
13.4. Изучение процессов активации клеток, связанных с изменением концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле	330
13.5. Методы регистрации внутриклеточной концентрации Ca^{2+}	333
<i>Литература</i>	341

ГЛАВА 14. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА В ПЕЧЕНИ	341
14.1. Методики воспроизведения повреждения печени	342
14.2. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот	343
14.3. Определение содержания гликогена в печени по Р. Крисман	354
14.4. Определение содержания холестерина в печени	356
14.5. Оценка цитотоксичности гепатотропных препаратов <i>in vitro</i>	357
14.6. Методы оценки апоптоза гепатоцитов	364
14.7. Оценка цитотоксичности с использованием культуры клеток Hep2 (на примере гемолимфы куколок дубового шелкопряда)	368
<i>Литература</i>	370
ГЛАВА 15. СОВРЕМЕННЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: ПРИНЦИПАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ, РАЗНОВИДНОСТИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ	371
15.1. Иммунохимический анализ: основные термины и понятия	372
15.2. Радиоиммунологический анализ	377
15.3. Иммуноферментный анализ	387
15.4. Развитие методов ИХА	392
15.5. Методы современного экспрессного иммунохимического анализа	394
15.6. Иммунохроматографический анализ	398
15.7. Перспективы развития средств иммунохимического анализа	401
<i>Литература</i>	404
ГЛАВА 16. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	404
16.1. ДНК-матрица	405
16.2. Праймеры (олигонуклеотиды)	407
16.3. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы	415
16.4. Проведение ПЦР	417
16.5. Методы ПЦР	419

16.6. Секвенирование ДНК	432
<i>Литература</i>	438
ГЛАВА 17. ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИ СТРЕССЕ И МЕТОДЫ ИХ ОЦЕНКИ	438
17.1. Подготовка материала для исследований	439
17.2. Воспроизведение стресса у растений	442
17.3. Методы исследования продуктов окислительной деградации макромолекул	444
17.4. Методы исследования антиоксидантной системы растительного организма	446
17.5. Рутинные биохимические параметры растительных объектов	457
17.6. Методы исследования растительных фенолов	462
17.7. Молекулярно-генетические исследования растительных объектов	466
<i>Литература</i>	468
ГЛАВА 18. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ PPAR	469
18.1. Структура и механизмы функционирования	470
18.2. Экспрессия генов <i>PPAR</i> в организме	472
18.3. Выделение и очистка суммарной РНК из животных тканей	474
18.4. Синтез кДНК на РНК-матрице	479
18.5. Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	481
<i>Литература</i>	485