

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ, БІОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БОТАНІКИ ТА ЕКОЛОГІЇ**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ ЕВОЛЮЦІЙНОЇ ЕКОЛОГІЇ
НАН УКРАЇНИ»**

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

**з курсу «Молекулярні та цитогенетичні основи
розвитку організмів»
до виконання лабораторних робіт з теми
«Біохімічні маркери»**

УДК

*Затверджено на засіданні Вченої ради факультету хімії, біології
і біотехнологій ДонНУ імені Василя Стуса
(протокол №..... від 18 червня 2021 р.)*

Рецензенти:

В. Г. Кур'ята, д-р біол. наук, професор, професор кафедри біології
Вінницького державного педагогічного університету імені Михайла
Коцюбинського,

О. В. Мудрак., д-р с.-г. наук, професор, завідувач кафедри екології,
природничих та математичних наук КВНЗ «Вінницька академія неперервної
освіти».

Методичні вказівки з курсу «Молекулярні та цитогенетичні основи
розвитку організмів» до виконання лабораторних робіт з теми «Біохімічні
маркери» / укладачі С. М. Бойко, Ю. Г. Приседський. Вінниця, 2021. 44 с., з
ілюстр.

Наведено методики до виконання практичних робіт з курсу «Молекулярні та
цитогенетичні основи розвитку організмів». Запропоновано різні варіанти визначення
концентрації білку у дослідних розчинах, методи їх розділення за допомогою
електрофорезу у різних гелях та умовах, проведення гістохімічних реакцій активностей
ферментів різних класів.

Методичні вказівки призначені для застосування під час навчання бакалаврів,
магістрів денної та заочної форм навчання та використання під час проведення
наукових досліджень викладачами, науковими співробітниками та аспірантами.

УДК

© Бойко С. М., 2021
© Приседський Ю. Г., 2021
© ДонНУ імені Василя Стуса, 2021

ВСТУП

Початок пошуку молекулярних маркерів для вирішення практичних завдань генетики та селекції рослин припадає на 1960-ті роки ХХ сторіччя. ДНК-технології в той час ще були відсутні, і вчені для оцінки і вивчення генетичної різноманітності стали використовувати поліморфізм білків. Маркери, засновані на виявленні генного продукту або продукту його активності, для візуалізації яких потрібен біохімічний аналіз, отримали назву біохімічних. До цього класу маркерів відносяться не тільки різного роду білки (запасні, транспортні, ферменти тощо), але і метаболіти (вуглеводи, вторинні метаболіти), які ідентифікують біохімічно після виділення з органів або тканин досліджуваного організму й очищення. Як маркери здебільшого використовуються запасні білки насіння рослин або ферменти. Метаболіти як маркери не отримали поширення внаслідок специфіки їх виявлення, що вимагає дорогого і часом спеціального обладнання (спектрофотометри, рідинні і газові аналізатори високого і низького тиску тощо). Однак застосування цієї групи біохімічних маркерів має значний потенціал, оскільки дає змогу відрізнити один генотип від іншого в порівняно короткі терміни; до того ж метаболіти переважно тканинино- і органоспецифічні.

Біохімічні маркери використовуються у дослідженнях з ідентифікації генотипу рослини, наприклад, як частина досліджень, що застосовується під час планування гібридизації. Перевагою біохімічних маркерів є можливість використання на великій кількості експериментальних об'єктів, ніж морфологічні. Аналіз за білковим спектром часто використовують для дослідження різноманітних рослин. Цей метод дає змогу визначати сортову чистоту партії насіння, проводити ідентифікацію сортів, перевіряючи їх відповідність. Селекціонерам застосування білкових маркерів дозволяє істотно скорочувати період створення нових форм.

Для білкових маркерів зазвичай характерною є більша відповідність між генотипом і фенотипом, до того ж шлях реалізації генетичних відмінностей у фенотипі для білкових маркерів значно коротший, ніж для морфологічних. Практичним застосуванням білкових маркерів є паспортизація сортів та гібридів, створення за виділеними білковими маркерами генетичного паспорта. Важливими напрямками використання біохімічних маркерів є дослідження особливостей патогенезу у рослинних об'єктів, виявлення ознак, які корелюють із підвищеним фітоімунітетом. Важливим елементом використання біохімічних маркерів у дослідженні рослин є їх застосування для вивчення стійкості до умов довкілля, і впливу антропічного навантаження також. Поліморфізм білків, що виявляються одновимірним електрофорезом, може бути підданий як якісним, так і кількісним змінам через вплив на рослини екологічного стресу, обумовлених, наприклад, недоліком елементів живлення або зміною температури повітря тощо. Тому ці методи можна широко використовувати для пошуку рослинних організмів, що відрізняються підвищеною стійкістю до несприятливих умов існування. Зокрема, з цією метою широко використовуються характеристики

ферментів антиоксидантних систем рослин (каталаза, пероксидаза, супекоксиддисмутаза).

Незважаючи на те, що з моменту опису біохімічних маркерів пройшло більше півстоліття, фізико-хімічні підходи до їх виявлення та ідентифікації методично майже не змінилися. Одним із сучасних методів лабораторного дослідження біохімічних маркерів білкової природи у рослин є електрофорез запасних білків та ізоферментів. Білки, які синтезуються у процесі розвитку рослин, їх гетерогенний склад не залежить від умов вирощування рослин і визначається генотипом та генетично закріплений у ряді поколінь. Це робить використання білкових маркерів зручним в інформаційному та практичному сенсі об'єктом. Легкість та доступність електрофоретичного розділення білків та виявлення білкових, зокрема і нативних ферментів, дають в руки дослідників сучасний і точний інструмент. Водночас необхідно враховувати можливість порушення структури і цілісності аналізованих молекул з огляду на різні причини, зокрема і через недотримання стандартних умов екстракції білків і поліпептидів під час виділення й очищення, електрофоретичного розділення, що може призводити до появи неспецифічних електрофоретичних спектрів. Оскільки у всіх живих організмах існує виродженість генетичного коду і не кожна заміна амінокислоти приводить до зміни заряду молекули (як і до істотної зміни молекулярної маси білка), всього 30 % нуклеотидних замін можуть викликати білковий поліморфізм, який проявиться під час електрофорезу. Тому використання біологічних маркерів є ефективним лише за суворого обліку всіх без винятку факторів, що накладають методичні, біологічні та інші обмеження. Тобто лише з дотриманням встановлених вимог біохімічні маркери можуть бути коректно і кваліфіковано використані в дослідженнях рослинних об'єктів.

ПРАВИЛА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ

Для успішного виконання лабораторних завдань необхідно дотримуватися основних правил роботи:

1. Посуд, в якому зберігаються розчини, сухі речовини, кислоти і луги, має бути щільно закритим, щоб запобігти розкладанню і випаровуванню цих речовин, а також попаданню в них пилу.

2. На всіх склянках і банках із реактивами повинні бути чітко написані етикетки із зазначенням назви реактиву і дати приготування.

3. Не можна зберігати реактиви в мірному посуді: циліндрах, мірних колбах тощо (цим посудом користуються тільки для приготування реактивів і вимірювання).

4. Щоб зберегти реактиви чистими, рештки невикористаних речовин не можна повертати в реактивні банки і склянки.

5. З леткими речовинами (соляна кислота, аміак та ін.) можна працювати тільки у витяжній шафі.

6. Зважувати хімічні реактиви треба тільки в скляному або фарфоровому посуді, дотримуючись правил зважування.

7. Під час приготування розчинів доливати розчинник до кінцевого об'єму можна тільки після повного розчинення речовини. Приготовлений розчин слід добре перемішувати.

8. Відкриваючи банку або склянку з реактивом, пробку слід тримати в руці або класти на стіл зовнішньою поверхнею.

9. Набирати розчини чистою піпеткою або циліндром.

10. Для вимірювання реактивів, які часто використовуються, бажано мати для кожного з них підписаний циліндр або піпетку.

11. Під час роботи з отруйними речовинами (ртуть, феноли та ін.) треба дотримуватися правил техніки безпеки.

12. Розливу ртуть старанно збирають піпеткою з грушею, мідною пластинкою, а ртуть у щілинах заливають 10%-им розчином FeCl_3 або засипають порошком сірки.

13. Необхідно пам'ятати, що для розбавлення концентрованої сірчаної кислоти треба кислоту лити у воду, а не навпаки.

14. Розливу кислоту нейтралізують лугом, а потім змивають великою кількістю води.

15. У лабораторії можна працювати тільки у спеціальному одязі (халат, рукавички, маска).

16. Не можна залишати в лабораторії без догляду увімкнені електроприлади.

ПЕРША ДОПОМОГА ЗА ТРАВМ ТА ОТРУСЬ

За термічних опіків не дозволяється змочувати обпечене місце водою. У жодному разі не можна проривати утворені пухирі і перев'язувати опік бинтом.

На обпечені місця накладають складені у кілька шарів разів бинт або марлю, змочені 3%-им розчином перманганату калію, 5%-им розчином таніну, етилового спирту або змащені спеціальним кремом від опіків.

У разі потрапляння кислоти (сірчаної, соляної, азотної, фосфорної) вражене місце промивають спочатку великою кількістю проточної води, потім 3–5%-им розчином гідрокарбонату натрію або 10%-им розчином вуглекислого амонію і знову промивають водою.

У разі опіків лугами після промивання великою кількістю води шкіру змочують 2–3%-им розчином оцтової кислоти або 1–2%-им розчином соляної кислоти і потім знову промивають водою.

При порізах битим скляним лабораторним посудом рану насамперед очищають від уламків скла стерильним пінцетом або стерильною марлею, зупиняють кровотечу, очищають поверхню шкіри навколо рани від бруду і обробляють краї ранги антисептиком (наприклад, розчином йоду).

При електротравмах потерпілому до прибуття лікаря забезпечують повний спокій і надходження свіжого повітря. Потерпілий не повинен робити зайвих рухів.

Робота 1 Способи вираження концентрації розчинів. Розрахунки для приготування розчинів

Мета роботи: засвоїти правила роботи в лабораторії, вивчити способи вираження концентрації розчинів, навчитися готувати розчини різних концентрацій.

Кожний розчин має якісну і кількісну характеристику. Якісний склад розчину визначається видом розчинника (вода або органічний) і характером розчиненої речовини, кількісний склад – кількісним співвідношенням розчинника і розчиненої речовини, а також концентрацією розчиненої речовини.

Розчини, в яких за певних умов речовина більше не розчиняється, називаються *насиченими*. Концентрація речовини в насиченому розчині – це розчинність речовини (за певних умов). Розчин, концентрація якого менша, ніж насиченого, називається *ненасиченим*. Із підвищенням температури розчинність речовин зазвичай збільшується. При охолодженні насичених розчинів утворюються *перенасичені* розчини.

Кількість розчиненої речовини, яка міститься в певній кількості розчину або розчинника, називається *концентрацією розчину*. Концентрація розчину може виражатися:

1. *Відсоткові розчини* – це розчини, в яких концентрація визначається кількістю розчиненої речовини в грамах у 100 г розчину – (*вагова процентна концентрація*), або кількістю речовини у грамах у 100 мл розчину (об'ємно-вагова концентрація):

$$C = \frac{m_b}{m_a + m_b} \times 100\%,$$

де, m_b – маса розчиненої речовини; m_a – маса розчинника.

2. *Молярні розчини* (М) – це розчини, в 1 л яких міститься певне число грам-молекул розчиненої речовини. Грам-молекула – це кількість речовини в грамах, яка чисельно дорівнює відносній молекулярній масі цієї речовини. Одномолярний розчин позначається 1М (1 моль/літр). Наприклад, молярна маса хлориду натрію становить 58,45, тому грам-молекула NaCl дорівнює 58,45. Отже, 1М розчин NaCl містить 58,45 г хлориду натрію в 1 л розчину.

3. *Нормальні розчини* (н) – це розчини, в 1 л яких міститься грам-еквівалент розчиненої речовини. Грам-еквівалентів – це кількість грамів речовини, еквівалентна грам-атому (або грам-іону) водню у певній реакції.

Для знаходження грам-еквівалента будь-якої речовини (Е) треба молекулярну масу речовини (М) розділити на число зарядів або електронів (n), які беруть участь у певній реакції

$$E = \frac{M}{n},$$

Грам-еквівалент не є сталою характеристикою певної речовини. Його величина залежить від хімічної реакції, в якій ця речовина бере участь.

Грам еквівалент *кислот* дорівнює молекулярній масі, поділеній на активність кислоти:

$$E_{\text{кислоти}} = \frac{M_{\text{кислоти}}}{\text{основність кислоти}}$$

Наприклад, для азотної кислоти HNO₃ еквівалентна маса дорівнює її молярній масі. Для сірчаної кислоти еквівалентна маса дорівнює 98 : 2 = 49. Для трьохосновної фосфорної кислоти еквівалентна маса дорівнює 98 : 3 = 32,6 г.

Грам еквівалент *лугів* дорівнює молекулярній масі, поділеній на число гідроксильних груп. Наприклад, еквівалентна маса гідроксиду магнію Mg(OH)₂ дорівнює 58,32 : 2 = 29,16 г.

Грам-еквівалент *солей* дорівнює молекулярній масі, поділеній на число атомів металу, який є в складі солі, і на валентність цього металу. Наприклад, еквівалентна маса сульфату натрію дорівнює 142 : (1 × 2) = 71 г, а еквівалентна маса сульфату алюмінію – 324 : (3 × 2) = 57 г.

Розрахунки для приготування розчинів

Приготування процентних розчинів. Процентні розчини є приблизними, тому наважку беруть на технохімічних терезах, а об'єм вимірюють мірними циліндрами. Для приготування процентних розчинів треба знати густину. Наводимо кілька способів розрахунку для приготування процентних розчинів.

Приклад 1. Скільки треба взяти кристалічної солі Na₂CO₃ × 10H₂O, щоб приготувати 100 мл 5%-го розчину Na₂CO₃, густина якого становить 1,05 г/мл? Вага 100 мл 5%-го розчину Na₂CO₃ дорівнює 100 × 1,05 = 105 г.

Потрібну кількість грамів Na₂CO₃ знаходять з пропорції:

Приготування нормальних розчинів із процентних. Для приготування нормальних розчинів із процентних треба знати густину і процентність.

Приклад 4. Треба приготувати 1000 мл 0,1 н. розчину H_2SO_4 з 90%-го розчину H_2SO_4 (густина 1,82 г/мл). H_2SO_4 – двохосновна кислота.

Для приготування 1 л 0,1 н. розчину H_2SO_4 треба взяти $98 : 2 : 10 = 4,9$ г концентрованої H_2SO_4 . Ця кількість кислоти міститься в X мл 90%-го розчину H_2SO_4 :

$$\begin{array}{l} 90 - 100 \\ 4,9 - X \end{array} \qquad X = \frac{4,9 \times 100}{90} = 5,44 \text{ г } 90\text{-ї } \text{H}_2\text{SO}_4$$

або $5,44 : 1,82 = 2,99$ мл.

Контрольні запитання

1. Які розчини називають насиченими, ненасиченими та перенасиченими?
2. Що таке відсоткові розчини і як їх готують?
3. Яка різниця між молярним та нормальним розчинами?
4. Наведіть приклади індикаторів. З якою метою вони використовуються?

ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Електрофорез – це рух заряджених колоїдних частинок під дією зовнішнього електричного поля. Фізичний принцип методу електрофорезу полягає в такому: макромолекули, які знаходяться в буферному розчині мають деяким сумарним електричним зарядом, величина і знак якого залежать від рН середовища. Якщо через цей розчин, укладений у канал з ізолюючого матеріалу, наприклад скляну трубку, почати пропускати електричний струм, то вздовж каналу встановиться певний градієнт напруги, тобто сформується електричне поле. Під дією поля макромолекули відповідно до своїх сумарних зарядів мігрують у напрямі катода або анода, причому їх тертя об навколишнє середовище обмежує швидкість міграції. Залежно від величини заряду і розмірів молекули набувають різні швидкості, і в цьому сутність процесу електрофорезу. Поступово вихідний препарат, що складався з різних молекул, поділяється на зони однакових молекул, які мігрують з постійною швидкістю.

Рухливість молекул в електричному полі дає змогу розділити білки на основі їхнього заряду. Залежно від реакції середовища і співвідношення кислих та основних амінокислот, білки в розчині мають або негативний, або позитивний заряд. Білки є амфотерними електролітами завдяки наявності в них карбоксильних і аміногруп, здатних до дисоціації. Полівалентний біполярний іон білка за наявності надлишку кислотних груп поводить як основа, а за наявності основних груп – як кислота.

Розділяти суміші білків методом електрофорезу почали ще у першій половині ХХ ст. Однак довгий час цей метод використовували лише в аналітичних дослідженнях. Протягом понад 30 років з цією метою використовувався доволі складний апарат Тізеліуса для електрофорезу рухомої границі. Усі сучасні електрофоретичні методи, як-от гель-електрофорез, ізоелектрофокусування, ізотахофорез, імунофорез, були розроблені з метою удосконалення способів аналізу суміші білків.

Швидкість переміщення макромолекул в електричному полі дає змогу визначити: молекулярну масу білків; відмінності макромолекул на основі їх сумарного заряду; форми молекул; зміни в амінокислотному складі білків – у разі заміни зарядженої амінокислоти на незаряджену чи навпаки; кількісне розділення різних видів молекул.

Молекула білка у розчині за будь-яких значень рН, які відрізняються від її ізоелектричної точки, має деякий чисельний заряд. Це приводить до того, що білок рухається в електричному полі. Якщо макромолекула має сумарний заряд z і перебуває в електричному полі E , то на неї діє сила $F = z \times E$.

Рушійна сила визначається величиною напруженості електричного поля E ($V \cdot cm^{-1}$), помноженій на сумарний заряд частинки z . Цій силі протидіють сили в'язкості середовища, пропорціональні коефіцієнту в'язкості η , радіусу частинки r і швидкості v .

$$zE = 6\pi \times \eta \times r \times v.$$

Тоді для сферичної молекули швидкість руху буде дорівнювати:

$$v = ze / 6 \pi \eta r v$$

Питома рухливість u визначається як швидкість на одиницю поля $u = v / E$, або $u = z / 6 \pi \eta r$.

Це доволі спрощений метод опису електрофорезу. Виходячи з того, що в будь-якому розчині присутні низькомолекулярні іони, які з різною силою зв'язані з полімером, макромолекула буде мігрувати в одну сторону, а протіоіони – в іншу. Енергія, яку необхідно було б витратити на подолання електростатичного притягання при розділенні сумарного заряду, надзвичайно велика, тому, насправді, загальна міграція буде незначна. Якщо результуюча рухливість не рівна нулю, то її величина буде деяким середнім значенням від рухливості макромолекул і протіоіонів так само, як і у випадку дифузії електролітів.

Для випадку, коли потенціал екранованого іона залишається постійним у зовнішньому електричному полі, шляхом складних розрахунків отримано аналітичний вираз для електричної рухливості сферичної молекули радіуса $a(r)$:

$$u = (z / 6 \pi \eta a) X1(ka) / (1 + \chi a),$$

де $X1(ka)$ – функція Генрі.

Згідно зі спрощеною теорією рухливість макроіону прямо пропорційна його заряду.

Водночас на швидкість молекул впливають і їх розміри. Залежно від величини заряду і розмірів молекули мають різну швидкість руху, і це дає змогу розділити суміш досліджуваних речовин на зони молекул, які мігрують з однаковою швидкістю:

$$v = RE,$$

де R – коефіцієнт пропорційності, який називають електрофоретичною рухливістю і дорівнює швидкості руху молекул за $E = 1$ В/см. Коефіцієнт пропорційності R пов'язаний з іншими факторами, які впливають на електрофоретичну рухливість. Основними чинниками, які впливають на електрофоретичну рухливість молекул, є властивості зразка, електричне поле, буферна суміш, природа і властивості носіїв.

Електрофоретична рухливість зростає зі збільшенням сумарного заряду молекули, величина якого залежить від значення рН середовища. Електрофоретична рухливість залежить від розмірів молекул. Чим більші розміри (молекулярні маси) молекул, тим менша їхня рухливість. Це зумовлено зростанням сил тертя й електростатичної взаємодії високомолекулярних сполук із навколишнім середовищем порівняно з молекулами менших розмірів. Молекули різної форми (наприклад, глобулярні та фібрилярні білки), проте однакової молекулярної маси, теж мають різну рухливість.

Чинники електричного поля (сила струму, напруга й електричний опір) також суттєво впливають на електрофоретичну рухливість молекул. Швидкість переміщення іонів зразка і буфера прямо пропорційна до сили струму (I), яка для відтворення результатів повинна бути постійною. Довжина шляху, який проходять іони, пропорційна до часу пропускання струму.

Електрофоретична рухливість пропорційна до електричної напруги (E) або градієнта напруги (В/см). В електрофорезі використовують як низькі (100–500 В), так і високі значення (500–10 000 В) напруги з градієнтом від 20 до 200 В/см.

Електричний опір R залежить від іонної сили буфера, кількості іонів зразка, типу і розміру носія. Зі збільшенням кількості іонів у системі та ширини носія електричний струм зменшується, а зі збільшенням довжини носія зростає.

Буфери впливають безпосередньо на електрофоретичну рухливість молекул. Для ефективного відведення тепла доцільно застосовувати буфери з низькою електропровідністю (трис-боратний, рН 8,0–9,0; трис-морфолінопропансульфатний, рН 7,0–8,0 та ін.), хоча в цьому випадку знижується швидкість міграції молекул. Зазвичай використовують буфери з сумарною іонною силою, яка є у межах концентрації 0,05–0,15 М. Це дає змогу знайти компроміс між нагріванням і низькою провідністю і використовувати високу напругу. Найпоширенішим є форміатний, ацетатний, цитратний, вероналовий, фосфатний, піридиновий, трис- та ЕДТА-буфери.

Як носії, у яких відбувається електрофорез, застосовують однорідні й порівняно інертні речовини, які насичують відповідним буфером. Але однією з проблем, пов'язаною з природою носія, є виникнення адсорбції – утримання молекул зразка носієм, як під час адсорбційної хроматографії. Це спричиняє розмивання зон на електрофореграмах, унаслідок чого зразок рухається не у вигляді смуги і має вигляді «комети», тобто зменшується розділення.

Інша проблема – електроосмос, зумовлений виникненням відносного електричного заряду між молекулами води буферного розчину і поверхнею носія. Внаслідок цього з молекул води можуть утворитися іони гідроксонію (H_3O^+), здатні захоплювати нейтральні речовини і прискорювати рух катіонів до катода, а швидкість руху аніонів у цьому випадку знижується. Отже, електроосмос спричиняє розширення зон на електрофореграмах, що зменшує ефект розділення молекул. Необхідно вживати спеціальних заходів для того, щоб потік рідини не виніс за межі носія препарат, який досліджують.

Ще одна проблема, яка виникає в разі використання гелів, – це наявність молекулярного сита. Гелі складаються з молекулярних ланцюгів, які не упорядковано переплітаються й утворюють ситоподібну структуру. Розмір пор гелів може варіювати в певних межах. У крохмальному, агаровому і поліакриламідному гелях молекули великого розміру рухаються крізь гель тим повільніше, чим менші розміри пор.

Для проведення електрофорезу необхідні:

1. «Канал», в якому йде поділ: колонка, пластина (вертикальний електрофорез), плоска ванна, прямокутний блок (горизонтальний електрофорез).
2. Зв'язок каналу з електродами, який здійснюється через резервуар із буфером (вертикальний електрофорез) або через з'єднувальний гніт (зазвичай вологий папір), який з'єднує кінці гелю з буфером (горизонтальний електрофорез).

Залежно від розмірів молекул, а також завдань їх розділення, електрофорез поділяють на:

- безпосередньо електрофорез – розділення порівняно високомолекулярних речовин (стара назва – катафорез);
- іонофорез – переміщення в електричному полі низькомолекулярних сполук (широко використовують у медицині для введення через шкіру і слизові оболонки лікарських препаратів, які є іонами);
- електродіаліз – відділення низькомолекулярних іонів від високомолекулярних;
- електроосмос – рух іонів крізь напівпроникну перетинку під впливом електричного поля.

Розрізняють також препаративний електрофорез (його застосовують для одержання порівняно великої кількості препаратів) та аналітичний електрофорез (для визначення компонентів у суміші, контролю чистоти тощо).

За способом розміщення носіїв розрізняють горизонтальний і вертикальний електрофорез, а за електричною напругою між електродами – низьковольтний (до 500 В) і високовольтний (понад 500 В).

Залежно від мети біохімічних досліджень найчастіше використовують такі електрофоретичні методи: фронтальний електрофорез (або метод рухомої межі), метод зонального електрофорезу (або електрофорез на носії), ізоелектрофокусування, ізотахофорез, імуноелектрофорез.

Кожен із цих методів має низку модифікацій, які в деяких випадках набувають певної самостійності. Основні з них: електрофорез у градієнті густини, в колонках, у блоці, неперервний (проточний), диск-електрофорез на носіях – папері чи аркушах ацетатцелюлози, у тонких шарах, гелях тощо.

Методологія електрофоретичного розділення, постійно вдосконалюючись, привела до того, що практично всі електрофоретичні аналізи білків та пептидів проводять у поліакриламідному гелі (ПААГ). Цей гель складається з двох мономерних компонентів:

- 1) акриламід – $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH}_2$,
- 2) NN'-метиленбісакриламід – $(\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH})_2-\text{CH}_2$.

Акриламід під дією ініціаторів полімеризації (наприклад персульфат натрію – ТЕМЕД) утворює лінійні полімери, а NN'-метиленбісакриламід використовується для «зшивання» лінійних полімерів акриламідів. Застосування цього матеріалу дозволило отримувати більш контрольовані, ніж у гелю з інших матеріалів, розміри пір. Склад буферів, що використовуються для електрофорезу білків не впливає на процес полімеризації акриламідів. Природа, концентрація і рН буфера визначаються особливостями самого процесу електрофорезу. Полімеризації ПААГ не заважає також присутність сечовини (навіть у високих концентраціях), гуанідинхлориду, формаміду, сахарози або інших детергентів, як-от ДСН, Тритон Х-100, цетавлон. Сахароза навіть сприяє полімеризації і покращує механічні властивості гелю.

Розміри пор варіюють концентрацією метиленбісакриламідів. Зазвичай використовують 6–20%-ий ПААГ. Для характеристики поліакриламідного гелю

необхідно вказувати відсотковий вміст мономерів (Т) і кількість агенту, що зшиває у відсотках від загальної кількості мономерів (С):

Співвідношення між кількістю агенту, що зшиває, й акриламідом дуже важливе, оскільки воно істотно впливає на механічні та фізичні властивості гелю. Було встановлено, що чим вища концентрація акриламіду, тим нижчою має бути концентрація бісакриламіду, і навпаки. Одночасне збільшення вмісту обох компонентів призводить до утворення гелів з підвищеною жорсткістю і крихкістю, а одночасне зниження – до зростання м'якості й еластичності.

Під час електрофорезу зони розчиненого білка залишаються невидимими. Для спостереження за процесом у вихідний препарат додають барвник («лідуючий барвник»), молекули якого несуть заряд того ж знака, що і молекули білка, але не взаємодіють з ним. Швидкість міграції барвника трохи вища за швидкість усіх білків, тому коли забарвлена зона («фронт електрофоретичного руху») доходить до кінця гелю, електрофорез припиняють.

Серед усього розмаїття методів електрофоретичного розділення білків із використанням поліакриламідного гелю виділяють кілька основних методик.

Нативний електрофорез у поліакриламідному гелі. Цей різновид електрофорезу розроблено для поділу білків, що знаходяться в нативній неденатурованій формі, і поділ білків відбувається відповідно до їхнього заряду та розміру. Умови поділу, включно з рН буферним розчином, підбираються відповідно до властивостей білків. Але переважно використовується рН у діапазоні 8–9, коли більшість білків мають сумарний негативний заряд і рухаються в електричному полі в напрямі до анода. Найчастіше використовують гелі з $T = 7\text{--}10\%$, проте, залежно від завдання, концентрація акриламіду може варіюватися в широкому діапазоні і залежить від молекулярної маси білків, присутніх у суміші. Для білків з молекулярною масою від 500 кДа і більше, проникнення в гель яких ускладнене, використовують гелі з $T = 3\text{--}4\%$ і $C = 0,1\%$; для білків з низькою молекулярною масою приблизно 10 кДа, відповідно, $T = 15\%$ і C до 1% .

Перевагою цього методу є те, що білки, які розділяються, знаходяться в нативній формі, наприклад, багато ферментів зберігають свою ферментативну активність. До недоліків слід віднести недосконалість розподільчої ефективності нативного електрофорезу – фракціонування білків відбувається відповідно до їхнього розміру і заряду. Як наслідок, білки з різними молекулярними масами можуть мати однакову рухливість.

Ступінчастий (перервний) електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (Disc-electrophoresis). Для проведення диск-електрофорезу необхідно контролювати 4 параметри:

- 1) структуру гелю;
- 2) значення рН буферного розчину гелю;
- 3) іонну силу буферного розчину;
- 4) природу іонів в гелі і в електродному буферному розчині.

Значення рН в цій системі відіграють дуже важливу роль і повинні вибиратися з урахуванням таких вимог:

1. У концентруючому гелі білки мають концентруватися в результаті ізотахофореzu, тобто всі заряджені компоненти рухаються в електричному полі з однаковими (ізо) швидкостями (тахо). За тих значень рН, які мають ці гелі, буферний (замикаючий) іон, що знаходиться в електродних судинах, повинен мати найменшу електрофоретичну рухливість.

2. Розподільчий гель повинен мати такий рН, щоб рухливість замикаючого іона в ньому була вищою, ніж рухливість будь-якого іншого компонента проби. У цьому разі замикаючий іон буде рухатися попереду білків.

Основна перевага диск-електрофореzu полягає в концентруванні білкових молекул, що поділяються, з утворенням дуже вузьких зон. Недоліком є те, що в процесі ізотахофореzu білки можуть досягати такої високої концентрації, що це викликає їх осадження. Крім того, деякі білки нестабільні в зоні рН, що використовується для їх дослідження цим методом.

Електрофоретична рухомість кожного білка залежить одночасно від його сумарного заряду, молекулярної маси і конфігурації поліпептидного ланцюга. Для встановлення суворої кількісної кореляції між одним із цих параметрів і електрофоретичною рухливістю білка потрібно унеможливити вплив усіх інших. Використання аніонного детергента додецилсульфату натрію (ДСН) дає змогу фракціонувати білки залежно від значень лише одного параметру – їхньої молекулярної маси. Для цього білки обробляють трикратним надлишком ДСН. Завдяки гідрофобним взаємодіям детергент приблизно однаково зв'язується з більшістю білків у співвідношенні 1,4 мг ДСН на 1 мг білка (1 моль ДСН на 2 амінокислотних залишки). Кожна молекула ДСН несе негативний заряд, і величезний надлишок їх перевищує власний сумарний заряд білка. Денатурований нерозгалужений поліпептид у цих умовах являє собою стрижень із сильним негативним зарядом. Співвідношення розмір / заряд у присутності ДСН стає практично однаковим для будь-якого білка, і розподіл відбувається за молекулярною масою, оскільки пори гелю працюють як молекулярні сита.

За необхідності білки, що містять дисульфідні містки, попередньо обробляють β-меркаптоетанолом або дитийотриетолом, щоб зруйнувати всі S-S-зв'язки. Внаслідок цієї маніпуляції ми отримуємо суміш ланцюгів даного білка, молекулярні маси яких можна виявити при електрофоретичному поділі.

Одним із варіантів електрофореzu в ПААГ є електрофорез у градієнті пористості ПААГ, тобто в гелях із мінливими уздовж напрямку міграції білків розмірами пор. Він схожий на електрофорез з ДСН тим, що поділ йде за розмірами молекул, а не за зарядом. Концентрація акриламідів змінюється по довжині пластинки від 25 % в нижній частині до 4 % у верхній частині. Робочий буферний розчин має високе значення рН, тому білки мігрують до аноду доти, поки через розміри пор гелю вони не зможуть рухатися далі.

Інша модифікація електрофореzu в ПААГ полягає у використанні цього методу для виявлення активних ферментів, наприклад протеолітичних ферментів різної специфічності. Для цього в гель заполімеризується субстрат потенційних ферментів, які необхідно ідентифікувати за активністю. Після

проведення електрофоретичного розділення пластину не фарбують, а піддають різним процедурам, загальний зміст яких спрямований на виявлення можливих ферментативних активностей у зразку, що аналізується.

Ізоелектричне фокусування. Ізоелектрична точка – це значення рН, за якого сумарний заряд речовини дорівнює нулю. Амфоліти (амфотерні електроліти) – це сполуки, що володіють як кислотними, так і лужними властивостями. Залежно від рН середовища їх сумарний заряд набуває позитивного, негативного або нульового значення. За допомогою ізоелектрофокусування можна фракціонувати тільки речовини з амфотерними властивостями, якими і є білкові молекули. Крім амфолітів-зразків існують амфоліти-носії, які створюють градієнт рН.

Якщо звичайний електрофорез заснований на поділі білків за їх рухливістю при даному значенні рН, то ізоелектричне фокусування полягає в тому, що створюється система з градієнтом рН. Білки, що рухаються в електричному полі, досягають у цій системі такої області, в якій значення рН дорівнює значенню їх ізоелектричної точки. За такого значення сумарний заряд білка дорівнює 0, і він не здатний переміщуватися в електричному полі.

Синтетичні амфоліти – носії (іноді їх називають амфолінами), що являють собою гетерогенну суміш різних поліамінополікарбонівих кислот. Умови синтезу направлені на утворення безлічі гомологів та ізомерів. Цей ряд сполук володіє неперервним спектром ізоточок від рН 3 до рН 10. Склад суміші, від якого залежить інтервал значень рН, можна регулювати фракціонуванням. Для створення градієнта рН суміш амфолітів поміщають у стабілізоване середовище і подають напругу.

Ізоелектричне фокусування має найвищу розподільчу здатність при поділі суміші білків, хоча цей метод не дозволяє розділяти білки залежно від величини їх молекул, як, наприклад, за електрофорезу. Особливу перевагу цього методу відображено в терміні «фокусування». В інших методах розділення білків дифузія і переміщення зон прогресують з часом. За ізоелектричного фокусування дифузія обмежена. Як тільки білкова молекула дифундує і потрапляє в зону, що відрізняється за значенням рН від її ізоелектричної точки, вона стає зарядженою і мігрує у зворотному напрямі.

Двовимірний електрофорез. Двовимірний електрофорез (2DE – two dimensional electrophoresis) являє собою метод розділення суміші білків, заснований на послідовному використанні двох властивостей білків: заряду і маси. Використання таких не пов'язаних між собою властивостей білків необхідне, щоб розділення суміші білків було максимальним.

Під час проведення першого напрямку (який ще має назву ізоелектрофокусування) поділ білків засновано на такій їх властивості, як наявність ізоелектричної точки (pI). Коли білок потрапляє в гель із градієнтом рН, до якого прикладене електричне поле, він починає рухатися до електрода з протилежним зарядом: позитивно заряджені білки переміщуються до катода (негативно заряджений електрод), а негативно заряджені – до анода (позитивно заряджений електрод). Під час міграції білок приєднує або втрачає протони, внаслідок чого його заряд і рухливість знижуються, і стає нульовою під час

досягнення точки в градієнті рН, яка дорівнює його рІ. У цій точці він вважається «сфокусованим», а на гелі виглядає як чітко окреслена пляма. За допомогою 2DE можливо розділити білки з дуже близькими значеннями рІ.

Далі гель, отриманий під час ізоелектрофокусування, кладуть горизонтально на вершину полімеризованого поліакриламідного гелю, і починається другий напрям, у процесі якого поділ ґрунтується на молекулярній масі білків. Внаслідок білки будуть представлені на електрофореграмі у вигляді плям, ідентифікація конкретних білків проводиться за допомогою різних гелъ-документуючих систем і мас-спектрометрії. Аналіз гелів, отриманих внаслідок 2DE, є складнішим порівняно з аналізом гелів, отриманих під час одновимірного електрофорезу, через більшу кількість виділених білків. Але це і є значною перевагою 2DE порівняно з одновимірним електрофорезом: одночасно можна аналізувати велику кількість білків зі схожими властивостями.

Контрольні запитання

1. Що таке метод електрофорезу? Визначити його цілі, переваги, недоліки.
2. Загальні правила проведення електрофоретичного дослідження.
3. Основні електрофоретичні терміни.
4. Фізичні параметри електрофорезу, критерії їх підбору.
5. Які параметри електрофоретичного розділення критично впливають на ефективність такого розділення і чому?
6. Пояснити, чому електрофорез проводять у буферах із низькою концентрацією солей?
7. Від яких факторів залежить рух зарядженої молекули в електричному полі?
8. За якими принципами класифікують електрофоретичні методи?
9. Види гелів. Особливості методичних підходів та умов їх полімеризації.
10. Що таке нативний електрофорез у поліакриламідному гелі? Дайте коротку характеристику.
11. Коротко охарактеризуйте метод ступінчастого (перервного) електрофорезу в ПААГ із використанням ДСН.
12. Ізоелектричне фокусування: принцип та особливості методу.
13. Двовимірний електрофорез: принцип дії, цілі, переваги, недоліки використання.
14. Чи має значення при двовимірному застосуванні електрофорезу і хроматографії порядок проведення операцій?
15. Пояснить, для чого для електрофорезу часто використовують дві буферні системи.
16. Чому електрофорез у поліакриламідному гелі замінив електрофорез у крохмальному гелі?
17. З якою метою використовують ДСН-гель-електрофорез у поліакриламідному гелі?
18. Обґрунтувати, чому за диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі у вертикальних колонках, в яких можна виділити три зони, заряджені молекули рухаються з різною швидкістю?

БІЛКИ ЯК БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ

Інформація, що міститься у ДНК, завдяки процесам транскрипції та трансляції реалізується у протеїнах. Завдяки своїй складній структурі протеїни функціонально поділяють на:

- структурні (колагенові, м'язові тканини);
- запасні (гліадини пшениці, хордеїни ячменю);
- ферменти (гідролази, трансферази, ізомерази, полімерази, лігази);
- транспортні (гемоглобін);
- регуляторні (беруть участь у регулюванні синтезу ДНК).

Кожен фермент є високоспецифічним щодо типу хімічної реакції та речовини (субстрату), на який він діє (табл.).

Таблиця. Класифікація ферментів

Клас ферментів	Тип реакції
Оксидоредуктази	Окислювально-відновні реакції всіх типів
Трансферази	Перенесення окремих атомів і груп атомів
Гідролази	Гідролітичні розщеплення хімічних зв'язків
Ліази	Негідролітичне розщеплення подвійних зв'язків або їх утворення
Ізомерази	Взаємоперетворення різних ізомерів
Лігази	Утворення зв'язків (синтез) із витратою енергії АТФ

Молекулярні маркери повинні відповідати певними вимогами, а саме: високий рівень поліморфізму; кодомінантність успадкування; рівномірний розподіл у геномі по хромосомах; селективно нейтральна поведінка; легка оцінка параметрів маркера; можливість автоматизації й оцінки параметрів маркера; висока відтворюваність оцінки параметрів маркера; низька собівартість та можливість легкого обміну даними між лабораторіями. Білкові молекули задовольняють більшості з них.

Маркерів для вирішення різних проблем біології широко використовуються дві основні групи білків – ферменти (ізоферменти) та запасні білки. Ізоферменти (ізоформи) – це генетично детерміновані множинні молекулярні форми ферментів, що мають однакову субстратну специфічність, але різняться за своєю первинною структурою і фізико-хімічними властивостями: рухливістю в електричному полі, спорідненістю до субстрату та інгібіторів, термостабільністю тощо (рис. 1).

Основним методом дослідження ізоферментів є електрофоретичний поділ білків у різних гелях: крохмальному, поліакриламідному, агаровому, з подальшим специфічним гістохімічним забарвленням з метою виявлення зон локалізації ферменту. Їх генетичний аналіз дає змогу виявити варіанти електроморфів, що кодуються альтернативними алелями в одному локусі, в цьому разі алельні продукти називаються *алозимами*. До недоліків ізоферментів належать: обмеженість ізоферментних систем на один вид (не більше 30) із відповідною кількістю маркерів; ферментативні локуси являють лише невелику

і не випадкову частину геному, отже, мінливість, що спостерігається, може бути нерепрезентативною для всього геному; зіставлення зразків різних видів, локусів та лабораторій є проблематичним, оскільки на них впливає методологія вилучення.

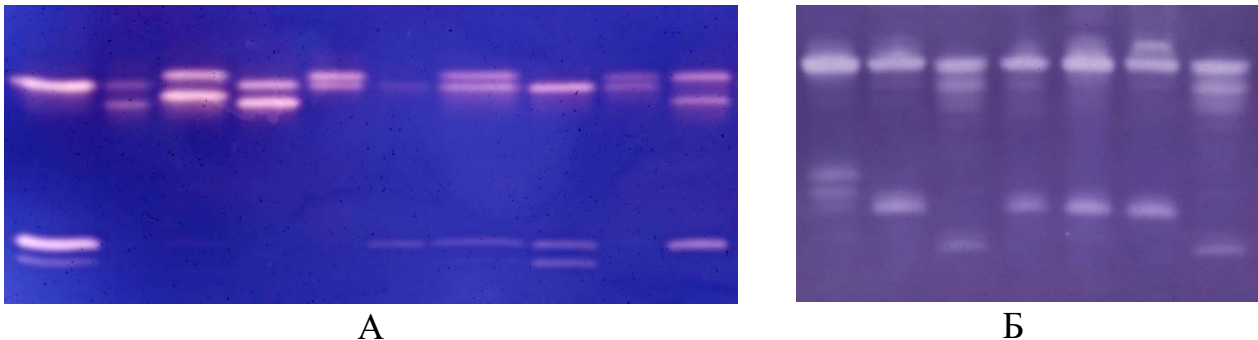


Рис 1. Внутрішньоклітинні ізоферменти α -амілази (А) базидієвого гриба *Schizophyllum commune* Fr. та супероксиддисмутази (Б) *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.

Популярність ізоферментів забезпечується їхньою повторюваністю та великою кількістю одногенних маркерів, які легко піддаються обробці статистичними методами. Алозими, будучи алельними варіантами ферментів, дають оцінку частоти генів та генотипів всередині та між популяціями. Ця інформація може бути використана для вимірювання розподілу популяцій, генетичного різноманіття, генетичного потоку, генетичної структури видів та зіставлення між показниками перекриття видів, структурою популяції та дивергенцією популяцій.

Робота 2 Методи кількісного визначення білка у біологічному матеріалі

Розчинні білки екстрагують із тканин, осаджують і після розчинення осаду визначають різними методами.

Біуретова реакція

Метод заснований на утворенні в лужному середовищі забарвленого у фіолетовий колір комплексу пептидних зв'язків з іонами двовалентної міді. Дозволяє визначити від 2 до 10 мг білку у пробі.

Матеріали та обладнання: піпетки, пробірки, колби на 100, 250 мл, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви:

1. Стандартний розчин білку (альбумін), що містить 10 мг в 1 мл.
2. Біуретовий реактив: 0,15 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ та 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислий натрій-калій, або сегнетова сіль) розчиняють в 50 мл H_2O , під час

перемішування доливають 30 мл 10%-го розчину NaOH, вільного від Na₂CO₃), додають 0,1 г KI і розчин доводять водою до 100 мл.

Перебіг роботи

До 1 мл розчину, що містить від 2 до 10 мг білку, додають 4 мл біуретового реактиву. Проби перемішують та залишають на 30 хв, після чого колориметрують на ФЕК за довжини хвилі 540 нм. Вміст білку в досліджуваних пробах розраховують за калібрувальним графіком, побудованим за стандартним розчином білку. Визначенню заважає присутність солей амонію.

Мікрометод з реактивом Бенедикта

Дозволяє визначити від 0,1 до 2 мг білку в пробі.

Реактиви:

1. Стандартний розчин білку (альбумін), що містить 1 мг в 1 мл.
2. Біуретовий реактив для мікрОВизначення (реактив Бенедикта): 17,3 г цитрату натрію та 10 г Na₂CO₃ розчиняють, підігріваючи у невеликій кількості води. У розчин додають 1,73 г сульфату міді, розчиненого в 10 мл води, і доводять водою до 100 мл.
3. 6%-й розчин Na OH.

Перебіг роботи

До 2 мл розчину, що містить 0,1–2 мг білку, додають 2 мл 6%-го розчину NaOH та 0,2 мл реактиву Бенедикта. Розчин добре перемішують та через 15 хв фотометрують за довжини хвилі 330 нм. Попередньо будують калібрувальний графік за стандартним розчином білка.

Метод Лоурі

Метод заснований на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислоті з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки. Метод характеризується високою чутливістю (10–100 мкг білка в пробі). На розвиток забарвлення впливає велика кількість речовин: компоненти буферних систем (трис-буфер у концентрації 0,2 ммоль, гліцилгліцин), відновники (цистеїн, аскорбінова кислота), комплексоутворювачі (ЕДТА в концентрації 0,5 ммоль), детергенти (тритон X-100 у концентрації 0,1–0,2 % викликає утворення осаду), сірчаноокислий амоній у концентрації 0,15 %, сахароза в концентрації 10 %. Через це при побудові калібрувального графіка для визначення білку за Лоурі в розчинник для приготування стандартного розчину білку необхідно включати всі компоненти, що містяться в аналізованих пробах. У деяких випадках доцільно проводити попереднє осадження білків із розчинів, наприклад трихлороцтовою кислотою (ТХУ), з подальшим розчиненням їх у лужних

розчинах, або очищення білкових розчинів від низькомолекулярних компонентів шляхом діалізу або гель-фільтрації на сефадексі.

Реактиви:

1. Стандартний розчин білку, що містить 0,25 мг в 1 мл.
2. 2%-й розчин Na_2CO_3 в 0,1%-му розчині NaOH .
3. 0,5%-й розчин $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-му розчині цитрату натрію.
4. Робочий розчин: 1 мл реактиву № 3 змішують зі 50 мл реактиву № 2.
5. Реактив Фоліна–Чокальтеу: 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (перекристалізований) та 2,5 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ поміщають у круглодонну колбу на 200–250 мл, доливають 70 мл води і добре перемішують. До отриманого розчину додають 5 мл 85%-го розчину фосфорної кислоти та 10 мл концентрованої HCl . Колбу приєднують до зворотного холодильника і кип'ячать протягом 10 год. Потім у розчин додають 15 г Li_2SO_4 , 5 мл H_2O й одну краплю бром. Розчин перемішують і нагрівають для видалення бром. Після охолодження доводять H_2O до 100 мл, фільтрують і розводять H_2O з таким розрахунком, щоб вийшов 1 н розчин кислоти. Реактив може зберігатися в темній склянці тривалий час.
6. 10%-й розчин $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ (ТХО).
7. 1 н розчин NaOH .

Перебіг роботи

До 0,4 мл досліджуваного розчину, що містить 10–100 мкг білка, доливають 2,0 мл робочого розчину (№ 4), перемішують і залишають за кімнатної температури на 10 хв. Потім додають 0,2 мл реактиву Фоліна–Чокальтеу, вміст пробірки ретельно перемішують і через 30 хв колориметрують за 750 нм. Вміст білка розраховують за калібрувальним графіком, побудованим за стандартним розчином. У разі попереднього осадження білка до розчину додають $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ (ТХО) з такого розрахунку, щоб кінцева концентрація її дорівнювала 3–4 %. Розчин ретельно перемішують і залишають на 10–20 хв. Осад білка відділяють центрифугуванням та промивають 2%-им розчином $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$. До осаду додають 1–2 мл 1 н розчину NaOH і обережно підігривають до розчинення осаду білка. Розчин білка кількісно переносять у мірну колбу на 25–50 мл, доводять водою до мітки, ретельно перемішують і проводять визначення білка.

З'єднання, що заважають. Багато біохімічних реагентів заважають кількісному визначенню білка, посилюючи фон або нівелюючи забарвлення з білком. До них належать: тирозин, триптофан і фенольні сполуки; буфери (трис, гліцин, гістидин, цитрат); цукри (сахароза, глюкоза, гліцерин); ЕДТА; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; тритон X-100.

Визначення білка з Кумасі синім

Метод заснований на зв'язуванні з білками одного із кислих барвників «Кумасі синій», що випускається у двох модифікаціях: R-250 та G-250. Під час

зв'язування з білками спектр поглинання барвника змінюється. Інтенсивність забарвлення має лінійну залежність у діапазоні 1–10 мкг білка/мл. Багато досліджених сполук не впливають на розвиток забарвлення. Наявність у середовищі інкубації детергентів викликає значне збільшення оптичної щільності. Оскільки білки розрізняються за своєю здатністю зв'язувати барвники, бажано будувати калібрувальний графік з використанням того білка, концентрацію якого в подальшому припускають визначати.

Реактиви:

1. Стандартний розчин білка, що містить 0,05 мг в 1 мл.
2. Розчин барвника. 10 мг барвника (Coomassie brilliant blue G) гомогенізують у скляному гомогенізаторі в 5 мл 96%-го спирту. Отриманий розчин змішують з 10 мл 95%-ї фосфорної кислоти, розводять водою до кінцевого об'єму 100 мл. Відфільтрований розчин барвника зберігається за кімнатної температури приблизно два тижні.

Перебіг роботи

1,5 мл розчину, що містить від 10 до 50 мкг білку, змішують з 1,5 мл розчину барвника (№ 2). Через 3–5 хв вимірюють оптичну щільність за довжини хвилі 595 нм, використовуючи контролером 1,5 мл барвника з 1,5 мл H₂O замість розчину білка.

Спектрофотометричний метод

Метод заснований на здатності ароматичних амінокислот (триптофану, тирозину, фенілаланіну) поглинати ультрафіолетове світло з максимумом довжини хвилі 280 нм. Вимірюючи оптичну густину, знаходять кількість білка в розчині. Оскільки білки відрізняються за вмістом ароматичних амінокислот, їх поглинання в ультрафіолетовій частині спектра може сильно відрізнятись. Умовно вважають, що «середній» вміст білка в розчині з концентрацією 1 мг/мл, за оптичної густини 280 нм дорівнює 1,0 (за товщини шару рідини в 10 мм). Визначенню білка цим методом заважає присутність нуклеїнових кислот і нуклеотидів.

Перебіг роботи

Вимірюють оптичну густину розчину за 260 нм (для обліку поглинання нуклеотидів) та 280 нм. Вміст білка розраховують за допомогою номограми (рис. 2): експериментально отримані значення оптичної густини за 260 і 280 нм знаходять у стовпцях номограми і з'єднують їх прямою лінією. Точка перетину цієї прямої зі шкалою, на якій наведена концентрація білка, визначає його вміст у дослідному розчині. Вміст білка можна знайти за формулою на основі даних визначення оптичної щільності за 280 та 260 нм:

$$\text{Вміст білка (мг/мл)} = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}.$$

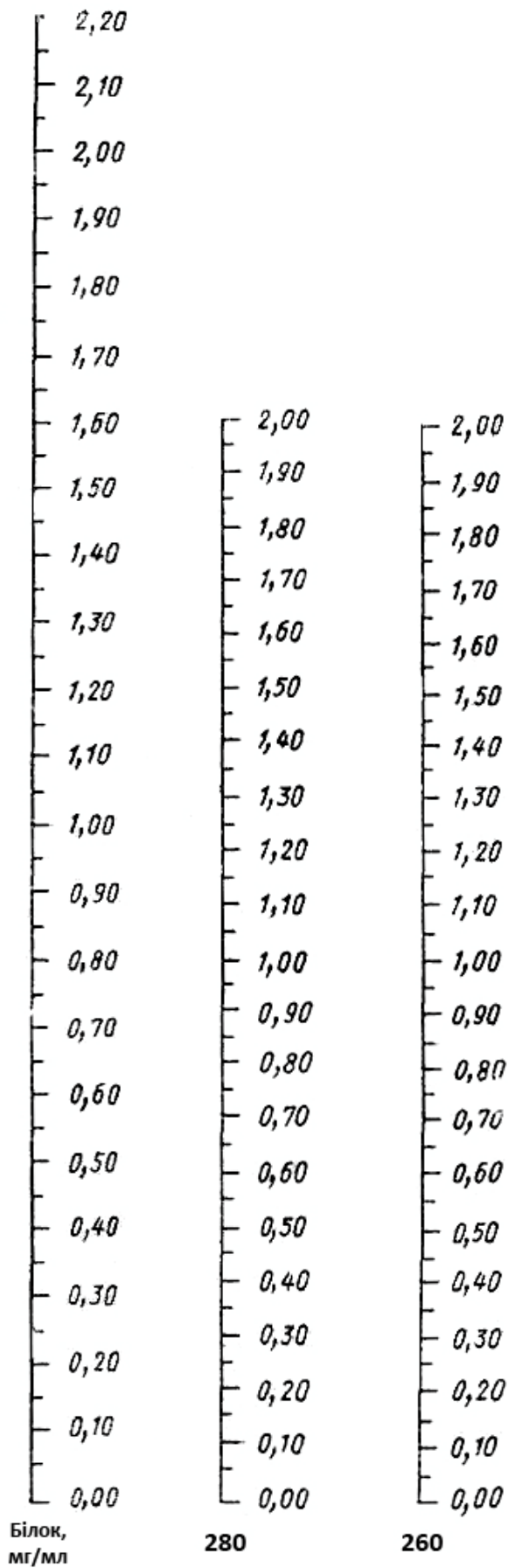


Рис. 2. Номограма визначення концентрації білка спектрофотометричним методом

Робота 3 Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі

Метод заснований на тому, що молекули, які мають електричний заряд, значення якого визначає рН та іонна сила навколишнього середовища, під впливом зовнішнього електричного поля пересуваються в розчині до протилежно зарядженого полюса. Швидкість переміщення пропорційна величині їх заряду й обернено пропорційна розміру і ступеню гідратації. Метод електрофорезу білків у поліакриламідному гелі володіє великою роздільною здатністю через те, що поділ сумішей йде не тільки по заряду, але і за розмірами і формою частинок. Перевагами методу є: хімічна стабільність та інертність гелю, можливість отримання гелів із заданою величиною пор, відсутність адсорбції й електроосмосу, стійкість до розчинників, змін температури та рН. Електрофоретичний поділ білків проводять як у трубочках, так і в тонкому шарі поліакриламідного гелю.

Реактиви:

1. ТЕМЕД (N, N, N', N'-Тетраметилетилендіамін) – реактив стабільний при зберіганні у холодильнику в нерозведеному вигляді. До суміші його додають безпосередньо перед полімеризацією.
2. 1%-й розчин персульфату амонію $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$, свіжоприготований.
3. 0,5%-й розчин амідовий чорний 10Б, готується на 7%-му розчині CH_3COOH . Розчин стабільний за кімнатної температури.
4. 0,1%-й розчин Кумасі G-250, готується на 7%-му розчині CH_3COOH .
5. 7%-й розчин CH_3COOH .
6. 40%-й розчин сахарози.

Реактиви для розділення білків з $pI < 7,5$:

7. Електродний буферний розчин, рН 8,3: 6,0 г Тріс та 28,8 г гліцину розчиняють у воді і доводять до 1 л. Розчин стабільний за температури $+4^\circ\text{C}$. Для використання в роботі основний розчин розбавляють у 10 раз.
8. Буферний розчин для приготування гелю, рН 8,9: до 36,3 г Тріс додають 48 мл 1 н розчину HCl та обсяг доводять водою до 100 мл. Розчин стабільний.
9. Розчин акриламід: 28 г акриламід та 0,735 г N,N'-метиленбісакриламід розчиняють у 100 мл води (спочатку розчиняють метиленбісакриламід, потім акриламід); розчин стабільний. **Увага!** Акриламід токсичний. Роботу проводять під тягою, в рукавичках!
10. Бромфеноловий синій – 1 мг в 100 мл води.

Реактиви для розділення білків з $pI > 7,5$

7. Електродний буферний розчин, рН 4,5: 31,2 г аланіну та 8 мл крижаної оцтової кислоти доводять водою до 100 мл. Для використання в роботі основний розчин розбавляють у 10 раз.

8. Буферний розчин для приготування гелю, рН 4,3: 48 мл 1 н розчину КОН змішують з 17,2 мл крижаної оцтової кислоти і доводять водою до 100 мл. **Увага!** Роботу з кислотою проводять під тягою, в рукавичках!

9. Розчин акриламіду: 60,0 г акриламіду та 0,4 г N,N'-метилен-бісакриламід розчиняють в 100 мл води. **Увага!** Акриламід токсичний. Роботу проводять під тягою, в рукавичках!

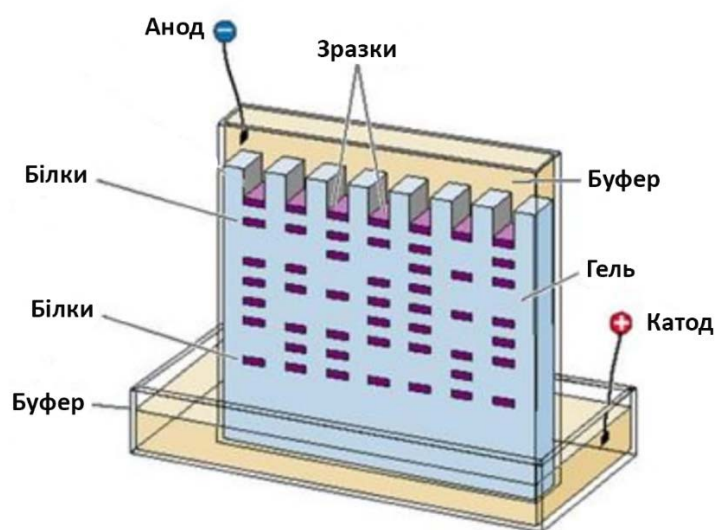
10. 0,1 % розчин метиленового зеленого.

Вертикальний електрофорез в поліакриламідному гелі

Електрофорез у пластині поліакриламідного гелю має низку переваг порівняно з електрофорезом у трубочках. Використання тонких пластин полегшує ефективно відведення тепла під час електрофорезу. Процес фіксації, фарбування і відмивання займає значно менше часу. Використання однієї пластини дає змогу в абсолютно ідентичних умовах проводити поділ відразу декількох (10–13) проб білка (рис. 3). На пластині можна наносити менше білка, ніж на циліндричні гелі. Залежно від використовуваного барвника, а також від природи білка на пластині поліакриламіда вдається виявити від 5 до 50 мкг білка. У приладі для вертикального електрофорезу в гель полімеризують безпосередньо в блоці. Товщину поліакриламідного гелю можна змінювати (1, 2 або 3 мм).



А



Б

Рис. 3. Прибор для вертикального електрофорезу (А). Принцип дії прибору для електрофорезу у пластинках поліакриламідного гелю (Б).

Якщо поділ проводять у гелі тільки одного типу, розчин заливають у блок доверху і відразу вставляють спеціальну «гребінку». Зубці її утворюють поглиблення на поверхні гелю, в які згодом вносять зразки білка. Якщо в роботі використовують два типи гелів (концентруючий та розділяючий), то в блок спочатку на 2/3 об'єму від дна заливають розчин для полімеризації розділяючого гелю. На нього обережно нашаровується, і блок залишають у вертикальному

положенні до полімеризації гелю. Воду видаляють, на поверхню розділяючого гелю наносять суміш для полімеризації концентруючого гелю до повного заповнення блоку та вставляють «гребінку». Після закінчення полімеризації видаляють одну з герметизуючих прокладок і вставляють блок у прилад. Контакт між електродними відсіками у приладі здійснюється через гель та пластину поліакриламідну. Після складання приладу електродні камери заповнюють буферним розчином, а в лунки на поверхні гелю мікродозатором вносять зразки білка. Необхідно, щоб густина зразків білка була більша за густину буферного розчину, тому розчин білка готують на 10%-му розчині сахарози. Після внесення зразків прилад підключають до джерела струму і проводять електрофорез. Після того як маркерний барвник (бромфеноловий синій), внесений до зразка білка, досягне нижньої межі пластини, джерело живлення вимикають, зливають електродні буфери та переносять гелеву пластину у плоску кювету. Подальші дії (фіксація, забарвлення, інкубація) проводять відповідно до протоколів.

Робота 4 Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію

Білки, оброблені концентрованим розчином додецилсульфату натрію в присутності 3-меркаптоетанолу, розпадаються на окремі поліпептидні ланцюги і набувають негативного заряду, що значно перевищує власний заряд білкової молекули. При подальшому поділі за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі білкові зони розподіляються на електрофореграмах так, що рухливість білкової зони обернено пропорційна логарифму молекулярної маси. Метод дає можливість визначати молекулярні маси субодиниць олігомерних білків. Електрофоретичний поділ можна проводити різними методами. Нижче наведено два основні: *метод Вебера–Осборна*, а також метод, запропонований *Леммлі*. У методі Вебера–Осборна буферні розчини для приготування гелю та електродні не відрізняються між собою. Зазвичай використовують 0,1 або 0,05 моль/л натрій-фосфатний буфер. У методі Леммлі гелевий та електродний буферні розчини відрізняються один від одного за складом і величиною рН. Крім того, використовують два типи гелів – концентруючий та розділяючий. Ці модифікації приводять до того, що на кордоні між концентруючим та розділяючим гелем весь білковий зразок збирається у вигляді вузького диску. Це сприяє більш чіткому розподілу білків.

Метод Вебера–Осборна

Реактиви:

1. 30%-й розчин акриламідну, що містить 0,6 % метиленбісакриламідну.

Увага! Роботу з акриламідом проводять під тягою та в рукавичках!

2. Буфер для приготування гелю: 0,2 М натрій-фосфатний буфер, рН 7,2.
3. Буфер для приготування зразків: 0,02 М натрій-фосфатний буфер, рН 7,2.
4. Електродний буфер: 0,05 М натрій-фосфатний буфер, рН 7,2.
5. 1,5-й розчин персульфату амонію (готують безпосередньо перед вживанням).

6. ТЕМЕД (N, N, N', N'-Тетраметилетилендіамін).
7. 40%-й розчин сахарози.
8. 70%-й ізопропиловий спирт.
9. 0,04%-й розчин барвника Кумасі R-250, приготовлений на 20%-му ізопропанолі та 10%-му CH_3COOH .
10. 10%-й розчин оцтової кислоти.
11. 10% й розчин додецилсульфату натрію (ДДС-Na).
12. β -меркаптоетанол.
13. Набір білків-маркерів з відомою молекулярною масою. Як білки-маркери можна використовувати такі: фосфорилаза (91 кДа), бичачий сироватковий альбумін (68 кДа), яєчний альбумін (42 кДа), інгібітор трипсину із сої (24 кДа), РНК-аза (14 кДа), цитохром С (12 кДа) та ін.

Підготовка зразків.

У розчини дослідних та стандартних білків, що містять 2-5 мг/мл, додають 10%-й ДДС-Na до кінцевої концентрації 1% та β -меркаптоетанол (для запобігання неспецифічній агрегації поліпептидних ланцюгів) до кінцевої концентрації 1–5%. Зразки витримують 5 хв за температури 90°C. Якщо дослідні або стандартні зразки знаходяться в розчинах, що містять іони K^+ або NH_4^+ , перед обробкою ДДС-Na їх потрібно знесолити діалізом або гель-хроматографією, оскільки додецилсульфат калію та амонію погано розчинні у воді.

Приготування гелю.

У колбу Ерленмейєра наливають 10 мл розчину акриламід, 15 мл фосфатного буферу, що містить 30 мг ДДС-Na, 3,5 мл H_2O , 1,5 мл персульфата амонію й 0,04 мл ТЕМЕД (розрахунки об'ємів здійснюються відповідно до робочої камери).

Проведення електрофорезу.

Поділ можна проводити як у трубочках, так і на пластинах для вертикального електрофорезу. Після обробки ДДС-Na до зразків додають сахарозу (до концентрації 10%) і як лідируючий барвник – бромфеноловий синій (до концентрації 0,001%). Зразки дослідних білків і білків-маркерів вносять на поверхню гелю в обсязі від 20 до 100 мкл. Навантаження на гель визначається методом забарвлення гелів, а також здатністю того чи іншого білка зв'язувати барвник, який використовується. Зазвичай при електрофорезі в трубочках вдається виявити від 20 до 100 мкг білка, при електрофорезі в пластинах – від 4 до 15 мкг.

В електродний буфер катодного відділення додають ДДС-Na до концентрації 0,1%. Електрофоретичний поділ проводять за кімнатної температури та сили струму 8 мА на трубочку. При цьому спочатку встановлюють силу струму 2 мА на трубочку (напруга приблизно 50 В), напругу піднімають до 100–200 В лише після того, як зразки увійдуть у гель. При проведенні електрофорезу в пластині напруженість електричного поля спочатку встановлюють на рівні 6–7 В/см, після входження зразків у розділяючий гель

напруженість можна збільшувати до 15–20 В/см. Поділ проводять доти, поки барвник не пройде 4/5 всієї довжини гелю. Після цього електрофорез припиняють, виймають гель та проводять його фіксацію у 70%-му ізопропанолі (0,5–1 годину). Потім гель фарбують розчином Кумасі R-250 протягом 2–3 годин. Надлишок фарби видаляють промиванням 10%-им розчином CH_3COOH .

Обробка електрофореграм.

Визначають відстань, пройдену кожним білком від стартової лінії. Визначення можна проводити візуально або за допомогою денситометра за 550–600 нм. Будують калібрувальний графік, відкладаючи по осі абсцис довжину шляху, пройденого цим білком, а по осі ординат – логарифм його молекулярної маси. Визначивши довжину шляху, яку пройшов білок із невідомою молекулярною масою, використовуючи калібрувальний графік, визначають молекулярну масу дослідного білка.

Метод Лемлі

Реактиви:

1. 30%-й розчин акриламід, приготовлений на 0,4%-му розчині метиленбісакриламід (29,6 г акриламід та 0,4 г метиленбісакриламід розчиняють у воді й об'єм розчину доводять до 100 мл). Розчин зберігають у темній склянці в холодильнику. **Увага!** Роботу з акриламідом проводять під тягою, в рукавичках!

2. Буфер для приготування розділяючого гелю: 1,5 М Трис-НСІ буфер, що містить 0,4%-й ДДС-На, рН 8,8.

3. Буфер для приготування концентруючого гелю: 0,5 М Трис-НСІ буфер, що містить 0,4%-й ДДС-На, рН 6,8.

4. Електродний буфер: 0,025 М Трис, 0,192 М гліцин, рН 8,6. Необхідну наважку гліцину розчиняють у воді та додають сухий трис до рН 8,6, після чого обсяг розчину доводять водою до потрібного об'єму. Електродний буфер катодного відділення камери містить, крім зазначених компонентів, ДДС-На у концентрації 0,1 %.

5. Буфер для приготування зразків: 0,0625 М Трис-НСІ буфер, рН 6,8, 2%-й ДДС-На, 10%-й розчин сахарози (або гліцерину), 0,001%-й бромфеноловий синій. Перед вживанням у зазначений розчин додають β -меркаптоетанол до кінцевої концентрації 5 %.

6. Персульфат амонію.

7. ТЕМЕД (N, N, N', N'-Тетраметилетилендіамін).

8. 70% розчин ізопропилового спирту.

9. 10%-й розчин оцтової кислоти.

10. 0,04%-й розчин Кумасі R-250, приготовлений на суміші: ізопропанол-етанол-оцтова кислота-вода у співвідношенні 2:1:1:6.

11. Набір білків-маркерів з відомою молекулярною масою.

Приготування гелю.

Для полімеризації 30 мл розділяючого гелю (12,5 %) змішують 12,5 мл розчину акриламиду, 7,5 мл буферу для розділяючого гелю та 10 мл води. Після деаерації до суміші додають 16 мг персульфату амонію і 18 мкл ТЕМЕД. Отриманий розчин заливають або в пластини, або в трубки. На поверхню розчину нашаровують воду. Після полімеризації видаляють воду шприцом. Готують суміш для концентруючого гелю. Змішують 4 мл розчину № 1 з 5 мл буферу для концентруючого гелю та додають 11 мл води (сумарний обсяг 20 мл). Отриману суміш деаерують, додають 15 мг персульфата амонію та 16 мкл ТЕМЕД і наносять на розділяючий гель. Зазвичай довжина концентруючого гелю у 5–6 разів менша за довжину розділяючого гелю.

Підготовка зразків.

Дослідні та стандартні білки-маркери розчиняють у буферному розчині для приготування зразків у кількості 1–2 мг/мл і нагрівають 5–10 хв на киплячій водяній бані. Досліджувані зразки білків не повинні містити іонів K^+ і NH_4^+ .

ГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

З моменту відкриття ізоферментів ферментний електрофорез застосовується для надання корисної інформації в широкому діапазоні біологічних та біохімічних галузей та різних сфер практичної діяльності людини. Використання ізоферментів та алозимів як генних маркерів суттєво вдосконалило знання в таких галузях, як популяційна та еволюційна генетика, генетика розвитку, молекулярна еволюція та ензимологія. Вони широко використовуються для вирішення багатьох системних проблем, а також для відновлення філогенетичних взаємозв'язків між спорідненими видами, мають суттєве значення для клінічної та діагностичної медицини та медичної генетики, племінного контролю сільськогосподарських організмів, сільськогосподарської ентомології, генетичного моніторингу забруднення навколишнього середовища, оцінки генетичних ресурсів, криміналістичної науки тощо.

Ферментний електрофорез залишається найпростішим та найпотужнішим інструментом для розділення та ідентифікації структурних генних продуктів другого рівня. Незважаючи на величезне розширення технологій ДНК та ДНК-маркерів протягом останніх двох десятиліть, існує кілька важливих і очевидних переваг ферментного електрофорезу та ізоферментів як генних маркерів. По-перше, гель-електрофорез та методи зимограми технічно прості і не вимагають багато часу. По-друге, генетичні поліморфізми у великій кількості локусів ядерних генів, розпорошених по геному, можна вивчати за допомогою цих методів із відносною легкістю, швидкістю та низькою вартістю. По-третє, про генотипічну інтерпретацію індивідуальних варіацій ізоферментних моделей зазвичай можна зробити прямий висновок із цих закономірностей, беручи до

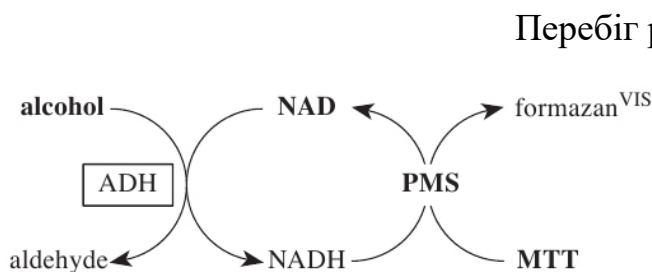
уваги кодомінантну експресію алельних ізоферментів (алозимів) та висококонсервовану структуру субодиниць ферментів. Нарешті, найважливіша перевага ізоферментів перед ДНК-маркерами полягає в тому, що їх дослідження може наблизити молекулярних еволюціоністів до реальних «речовин» адаптивного розвитку.

Робота 5 Визначення алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, найпростіших, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: метилтіазоліл тетразолій (тіазоліл синій), феназин метосульфат, НАД, етанол, Трис-НСІ буфер рН 8,5.



Попередньо готують фарбувальний розчин (50 мл): 0,05М Трис-НСІ буфер рН 8,5 – 50 мл; етанол – 2 мл; НАД – 40 мг; метилтіазоліл тетразолій – 10 мг; феназин метосульфат – 1 мг. Після проведення

електрофорезу гелю обережно виймають з приладу та переносять у ванночку. Додають фарбувальний розчин та інкубують гелю у темряві за температури 37°C, поки не з'являться темно-сині смуги. Гелю промивають у воді та фіксують у 25%-му етанолі.

Робота 6 Визначення сорбітолдегідрогенази (КФ 1.1.1.14)

Фермент присутній у бактеріях, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: нітро-блакитний тетразолій, феназин метосульфат, НАД, D-сорбітол, Трис-НСІ буфер рН 8.0.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 0,05М Трис-НСІ буфер рН 8,0 – 100 мл; D-сорбітол – 500 мг; НАД – 10 мг; нітро-блакитний тетразолій – 15 мг; феназин метосульфат – 2 мг. Після проведення електрофорезу гелю обережно виймають з приладу та переносять у ванночку. Додають фарбувальний розчин та інкубують гелю у темряві за температури 37°C, поки не з'являться темно-сині смуги. Гелю промивають у воді та фіксують у 25%-му етанолі.

Робота 7 Визначення глюкозодегідрогенази (КФ 1.1.1.47)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: метилтіазоліл тетразолій (тіазоліл синій), феназин метосульфат, НАД, D-глюкоза, 0,05М Фосфатний буфер рН 7.3.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 0,05М Фосфатний буфер рН 7.3 – 50 мл; D-глюкоза – 5 мг; НАД – 30 мг; метилтіазоліл тетразолій – 8 мг; феназин метосульфат – 3 мг. Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Додають фарбувальний розчин та інкубують гель у темряві за температури 37°C, поки не з'являться темно-сині смуги. Гель промивають у воді та фіксують у 25%-му етанолі.

Робота 8 Визначення гліцеролдегідрогенази (КФ 1.1.1.47)

Фермент присутній у грибах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: метилтіазоліл тетразолій (тіазоліл синій), феназин метосульфат, НАДФ, гліцерол, 0,1М Трис-НСІ буфер рН 8,5.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 0,1М Трис-НСІ буфер рН 8,5 – 95 мл; гліцерол – 5 мл; НАДФ – 8 мг; метилтіазоліл тетразолій – 10 мг; феназин метосульфат – 2 мг. Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Додають фарбувальний розчин та інкубують гель у темряві за температури 37°C, поки не з'являться темно-сині смуги. Гель промивають у воді та фіксують у 25%-му етанолі.

Робота 9 Визначення глюкозооксидази (КФ 1.1.3.4)

Фермент присутній у грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: нітро-блакитний тетразолій, феназин метосульфат, D-глюкоза, 0,05М Трис-НСІ буфер рН 8,0.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 0,05М Трис-НСІ буфер рН 8,0; 37 мМ D-глюкози; 0,24 мМ нітро-блакитний тетразолій; 0,16 мМ феназин метосульфат. Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Додають фарбувальний розчин та інкубують гель у темряві за температури 37°C, поки не з'являться темно-сині смуги. Гель промивають у воді та фіксують у 25%-му етанолі.

Робота 10 Визначення лакази (КФ 1.10.3.2)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: диметил-п-фенілендіамін, 0,1М Фосфатний буфер рН 6,5, α -нафтол.

Перебіг роботи

Попередньо готують два фарбувальні розчини: А (0,1М Фосфатний буфер рН 6,5; 0,01 М диметил-п-фенілендіамін) В (0,1М Фосфатний буфер рН 6,5; 0,01М α -нафтол). Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Змішують рівні обсяги розчинів А і В та інкубують гель у темряві за кімнатної температури, поки не з'являться темно-сині смуги. Гель промивають у воді та фіксують у 25%-му етанолі.

Робота 11 Визначення каталази (КФ 1.11.1.6)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: фериціанід калію, хлорид заліза, перекис водню.

Перебіг роботи

Попередньо готують три фарбувальні розчини: А (3%-й перекис водню), В (2%-й фериціанід калію), С (2%-й хлорид заліза). Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Гель інкубують 15 хвилин у розчині А. Промивають гель водою та занурюють його в суміш розчинів В і С (1:1). Акратно перемішують лоток кілька хвилин. На синьо-зеленому фоні з'являються жовті смуги активності каталази. Промийте забруднений гель у воді.

Робота 12 Визначення супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 0,05М Трис-НСІ буфер рН 8,5, метилтіазоліл тетразолій (тіазоліл синій), магнію хлорид, феназин метосульфат.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 0,05М Трис-НСІ буфер рН 8,5 – 80 мл; метилтіазоліл тетразолій – 10 мг; феназин метосульфат – 6 мг; $MgCl \times 6H_2O$ – 15 мг. Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку з розчином. Гель інкубують за яскравого освітлення. Смуги ізоферментів виглядають як світлі зони на темно-синьому фоні.

Робота 13 Визначення пероксидази (КФ 1.11.1.7)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 0,1 М фосфатний буфер рН 7,0, 1,0 мМ пероксид водню (H_2O_2), 2,0 мМ гваякол, ацетатний буфер рН 5,2, 5,0 мМ розчин бензидину, 0,3%-й пероксид водню (H_2O_2), 0,1 М фосфатний буфер рН 5,0, 0,1%-й пероксид водню (H_2O_2), 1 мМ розчин 2,2'-азино-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти (ABTS)).

Перебіг роботи

Ізоферментний спектр пероксидази може бути виявлений кількома способами, кожен з яких має свої переваги та недоліки. Кожний із хромогенів, який використовується для забарвлення зон, є специфічним до певних ізоферментів, тому часто у методах визначення наводять назви гваякол-пероксидаза, бензидин-пероксидаза тощо. Із наведених методів для проявлення пероксидази найчастіше використовують забарвлення бензидином (спосіб 1).

Спосіб 1. Для візуалізації ізоформ пероксидази після електрофорезу гель інкубують протягом 10 хв в охоложеному 5 мМ розчині бензидину в Na-ацетатному буфері (рН 5,2), промивають дистильованою водою і витримують у 0,3%-му розчині пероксиду водню до появи синього забарвлення.

Спосіб 2. Після електрофоретичного розділення електрофореграми інкубують у розчині, який складається з 0,1 м фосфатного буферу (рН 7,0), 1,0 мМ пероксиду водню (H_2O_2) та 2,0 мМ розчину гваяколу. Зони пероксидази проявляються у вигляді коричневих смуг.

Спосіб 3. Пластинки гелю після електрофоретичного розділення білків занурюють на кілька хвилин у реакційну суміш, що складається з 0,1 М фосфатного буфера (рН 5,0) пероксиду водню (0,1 % розчин) та 2,2'-азіно-біс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти (хромоген)). Зони білка, які мають пероксидазну активність, проявляються у вигляді червоних смуг.

Робота 14 Визначення естерази (КФ 3.1.1 ...)

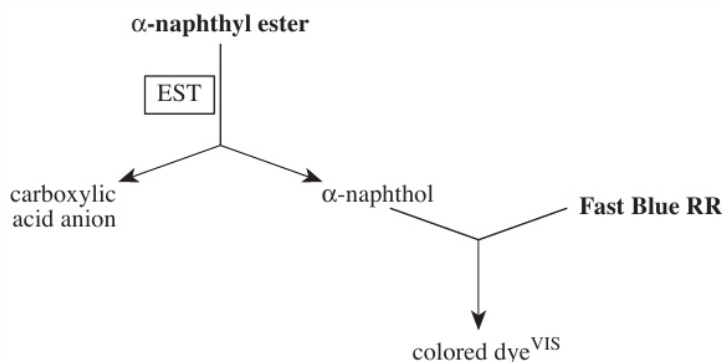
Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 0,05М фосфатний буфер рН7,2, α -нафтил ацетат, барвник швидкий синій RR.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 0,05 М фосфатний буфер рН 7,2 – 100 мл; α -нафтил ацетат (розчинений у 1 мл ацетону) – 10 мг; швидкий синій RR – 50 мг. Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Інкують гель у фарбувальному розчині в темряві за температури 37°C, поки не з'являться чорні смуги. Змити забарвлений гель водою і зафіксувати у 3%-й оцтовій кислоті.



Робота 15 Визначення лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 60 мМ боратний буфер рН 9,7, α -нафтил фосфат, барвник швидкий синій RR, $MgCl_2$.

Перебіг роботи

Попередньо готують фарбувальний розчин: 60 мМ боратний буфер рН 9,7 – 100мл; α -нафтил фосфат – 50 мг; швидкий синій RR – 50 мг, 10 мМ $MgCl_2$. Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Інкують гель у фарбувальному розчині у темряві за

температури 37°C, поки не з'являться чорні смуги. Змити забарвлений гель водою і зафіксувати у 25%-му етанолі.

Робота 15 Визначення кислій фосфатази (КФ 3.1.3.2)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, водоростях, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 0,1 М цитратний буфер рН 5,5, фенолфталеїну монофосфат (динатрієва сіль), NH₄OH (конц.).

Перебіг роботи

Попередньо готують два фарбувальні розчини: А (0,1 М цитратний буфер рН 5,5 – 25 мл; фенолфталеїну монофосфат (динатрієва сіль) – 50 мг), В (NH₄OH (конц.) – 5 мл). Після проведення електрофорезу наливають розчин А поверх фільтрувального паперу та накладають гель й інкубують за температури 37°C протягом 1,5–2 години. Виймають фільтрувальний папір та покривають гель розчином В. Червоні смуги, що вказують на локалізацію активності кислій фосфатази на гелі, з'являються через 1–2 хвилини.

Робота 16 Визначення α-амілази (КФ 3.2.1.1)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних та хребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 50 мМ Na-ацетатний буфер рН 5,5, CaCl₂, I₂, KI.

Перебіг роботи

У дослідний гель до полімеризації вноситься крохмаль (0,3 %). Попередньо готують два фарбувальні розчини: А (50 мМ Na-ацетатний буфер рН 5,5 – 100 мл; 1 М CaCl₂ – 2 мл), В (10 мМ I₂, 14 мМ KI). Після проведення електрофорезу гель покривають розчином А та інкубують за температури 37°C протягом 1 години. Після розчин зливають та промивають гель дистильованою водою, потім покривають розчином В. Області активності ферментів розвиваються на темно-синьому фоні гелю у вигляді світло-блакитних або напівпрозорих смуг, залежно від часу інкубації та активності ферменту.

Робота 17 Визначення ендо-1,3(4)- β -глюканази (КФ 3.2.1.6)

Фермент присутній у бактеріях, грибах, рослинах, безхребетних організмах.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби на 250 мл, ванночка за розміром гелю, мірні циліндри, шейкер, термостат, ваги.

Реактиви: 0,1 М ацетатний буфер рН 5,0, дитіотретол, барвник Конго червоний, NaCl.

Перебіг роботи

У дослідний гель до полімеризації вносять Na-КМЦ (0,1 %). Попередньо готують три фарбувальні розчини: А (0,1 М ацетатний буфер рН 5,0; 10 мМ дитіотретол), В (барвник Конго червоний – 1 мг/мл), С (1 М NaCl). Після проведення електрофорезу гель обережно виймають із приладу та переносять у ванночку. Гель інкубують протягом 30–60 хвилин у розчині А. Промивають гель водою та занурюють його в розчин В на 10 хвилин за кімнатної температури, акуратно перемішуючи лоток. Витримують гель у розчині С ще 10 хв. На темно-червоному тлі гелю видно ахроматичні або світло-жовтуваті смуги активності ферменту.

БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

Гліцин – HCl буфер (0,05 М); рН 2,2–3,6

(Гліцин, м. в. = 75,07)

рН	Гліцин 0,2 М, мл	HCl 0,2 н, мл	рН	Гліцин 0,2 М, мл	HCl 0,2 н, мл
2,2	50	44,0	3,0	50	11,4
2,4	50	32,4	3,2	50	8,2
2,6	50	24,2	3,4	50	6,4
2,8	50	16,8	3,6	50	5,0

Об'єм довести дистильованою водою до 200 мл.

Na-Цитратний буфер (0,1 М); рН 3,0–6,0

(Лимонна кислота × H₂O, м. в. = 210,14; Na-цитрат × 2H₂O, м. в. = 294,12)

рН	Лимонна к-та 0,1 М, мл	Na-цитрат 0,1 М, мл	рН	Лимонна к-та 0,1 М, мл	Na-цитрат 0,1 М, мл
3,0	16,4	3,6	4,6	8,9	11,1
3,2	15,5	4,5	4,8	8,0	12,0
3,4	14,6	5,4	5,0	7,0	13,0
3,6	13,7	6,3	5,2	6,1	13,9
3,8	12,7	7,3	5,4	5,1	14,9
4,0	11,8	8,2	5,6	4,2	15,8
4,2	10,8	9,2	5,8	3,2	16,8
4,4	9,9	10,1	6,0	2,3	17,7

Ацетатний буфер (0,2 М); рН 3,6–5,8

(Na-ацетат × 3H₂O, м. в. = 136,09)

рН	Na-ацетат 0,2 М, мл	CH ₃ COOH 0,2 М, мл	рН	Na-ацетат 0,2 М, мл	CH ₃ COOH 0,2 М, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Трис-НСІ буфер (0,05 М); рН 7,2–9,1
(Трис-(оксиметил)-амінометан, м.в. = 121,14)

рН	Трис – 0,2 М, мл	НСІ 0,2 М, мл	рН	Трис – 0,2 М, мл	НСІ 0,2 М, мл
7,20	25	45,0	8,14	25	25,0
7,36	25	42,5	8,23	25	22,5
7,54	25	40,0	8,32	25	20,0
7,66	25	37,5	8,40	25	17,5
7,77	25	35,0	8,50	25	15,0
7,87	25	32,5	8,62	25	12,5
7,96	25	30,0	8,74	25	10,0
8,05	25	27,5	9,1	25	5,0

Об'єм довести дистильованою водою до 100 мл.

Боратний буфер (0,2 М); рН 7,4–9,0
($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (бура), м. в. = 381,43; Борна кислота, м. в. = 61,84)

рН	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times$ $10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Борна к-та 0,2 М, мл	рН	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times$ $10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Борна к-та 0,2 М, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5
7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Гліциновий буфер (0,05 М); рН 8,6–10,6
(Гліцин, м. в. = 75,07)

рН	Гліцин 0,2 М, мл	NaOH 0,2 М, мл	рН	Гліцин 0,2 М, мл	NaOH 0,2 М, мл
8,6	50	4,0	9,6	50	22,4
8,8	50	6,0	9,8	50	27,2
9,0	50	8,8	10,0	50	32,0
9,2	50	12,0	10,4	50	38,6
9,4	50	16,8	10,6	50	45,5

Об'єм довести дистильованою водою до 200 мл.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук. думка, 1982. 550 с.
2. Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. Москва: Мир, 1982.
3. Электрофоретичні методи аналізу / А. Ю. Куліков, О. С. Чернишова, Н. О. Нікітіна. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2013. 68 с.
4. Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. Т. 2. / под ред. проф. И. Габриэля. Киев: Наш формат, 2016. 261 с.
5. Шкода О. С., Крісанова Н. В. та ін. Запоріжжя: ЗДМУ, 2015. 115 с.
6. Александрова К. В., Шкода О. С., Васильев Д. А. та ін. Ферменты: методичний посібник для викладачів. Запоріжжя, 2016. 50 с.
7. Basic Methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual. Edited by Richard J. Simpson. 2009. 436 pp.
8. Biochemicals for the Diagnostic Industry 1999/2000. Roche Molecular Biochemicals. 8th edition. P. 131–293.
9. Doolittle, D. P. 1987. Population Genetics: Basic Principles. Springer-Verlag, Berlin.
10. Ghowsi K. Electrophoresis / InTech Press, 2012. 234 pp.
11. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments / Wiley and Sons, 2009. 836 pp.
12. Keren D. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis / ASCP Press, 2012. 402 pp.
13. Magdeldin S. Gel Electrophoresis – Principles and Basics / InTech Press, 2012, 366 pp.
14. Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press, 2003. 553 p.
15. Methods for Investigation of Amino Acid and Protein Metabolism / Edited By Antoine E. El-Khoury. 2019. CRC Press. 280 p.
16. Perrey R., Hauser M.-T., Wink M. Cellular and Subcellular Localization of Peroxidase Isoenzymes in Plants and Cell Suspension Cultures from *Lupinus polyphyllus*. Z. Naturforsch. 1989. P. 931–936.
17. Perrey R., Hauser M.-T., Wink M. Cellular and Subcellular Localization of Peroxidase Isoenzymes in Plants and Cell Suspension Cultures from *Lupinus polyphyllus*. Z. Naturforsch. 1989. p. 931–936.
18. Sheehan D., Tyther R. Two-Dimensional Electrophoresis Protocols (Methods in Molecular Biology) / Springer, 2009. 250 pp.
19. Soltis, D.E. and P. Soltis (eds.). 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, OR.
20. Dhawan B. C. Textbook of Electrophoresis / Pearl Books, 2008. 232 pp.
21. Westermeier R. Electrophoresis in Practice / Wiley-VCH, 2001. 352 pp.

Зміст

ВСТУП.....	3
ПРАВИЛА БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ	5
ПЕРША ДОПОМОГА ЗА ТРАВМ ТА ОТРУЄНЬ	5
Робота 1 Способи вираження концентрації розчинів. Розрахунки для приготування розчинів.....	6
ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ	10
БІЛКИ ЯК БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ	18
Робота 2 Методи кількісного визначення білка у біологічному матеріалі	19
<i>Біуретова реакція</i>	19
<i>Мікрометод з реактивом Бенедикта</i>	20
<i>Метод Лоурі</i>	20
<i>Визначення білка з Кумасі синім</i>	21
<i>Спектрофотометричний метод</i>	22
Робота 3 Електрофоретичне розділення білків	24
у поліакриламідному гелі	24
Робота 4 Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію	26
<i>Метод Вебера–Осборна</i>	26
<i>Метод Лемлі</i>	28
ГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ	29
Робота 5 Визначення алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1)	30
Робота 6 Визначення сорбітолдегідрогенази (КФ 1.1.1.14).....	30
Робота 7 Визначення глюкозодегідрогенази (КФ 1.1.1.47)	31
Робота 8 Визначення гліцеролдегідрогенази (КФ 1.1.1.47).....	31
Робота 9 Визначення глюкозооксидази (КФ 1.1.3.4).....	31
Робота 10 Визначення лакази (КФ 1.10.3.2).....	32
Робота 11 Визначення каталази (КФ 1.11.1.6).....	32
Робота 12 Визначення супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1).....	33
Робота 13 Визначення пероксидази (КФ 1.11.1.7).....	33
Робота 14 Визначення естерази (КФ 3.1.1 ...).....	34
Робота 15 Визначення лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1)	34
Робота 15 Визначення кислої фосфатази (КФ 3.1.3.2)	35
Робота 16 Визначення α -амілази (КФ 3.2.1.1).....	35
Робота 17 Визначення ендо-1,3(4)- β -глюканази (КФ 3.2.1.6).....	36
БУФЕРНІ РОЗЧИНИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39