

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНІКОВА

**В. А. Топтіков, О. М. Єршова, О. О. Ковтун,
Т. І. Лавренюк, В. М. Тоцький**

**ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
АДАПТИВНОСТІ ТВАРИН ТА ЇХ УГРУПОВАНЬ**

НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК

ОДЕСА
ОНУ
2017

УДК 575.826:571.1:573.4(075.8)
Т582

Рекомендовано до друку Науково-методичною радою
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 2 від 20.04.2017 р.

Рецензенти:

В. П. Герасименко, доктор біологічних наук, професор Одеського державного аграрного університету;

Н. Е. Волкова, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу геноміки і біотехнології Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення;

І. І. Романовська, доктор біологічних наук, професор лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України.

Топтіков В. А.

Т582

Генетико-біохімічні дослідження адаптивності тварин та їх угруповань: навчально-методичний посібник / В. А. Топтіков, О. М. Єршова, О. О. Ковтун, Т. І. Лавренюк, В. М. Тоцький – Одеса : Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2017. – 140 с.

ISBN 978-617-689-243-4

Представлені методи визначення основних компонентів антиоксидантної системи. Викладено теорію електрофоретичного аналізу білків та методи виявлення різних ферментів на електрофореграмах. Сформульовано підходи стосовно використання результатів ізозимного аналізу у генетиці. Особлива увага приділяється дослідженням на тканинах важливого для сучасної екології Чорного моря виду – рапани.

Навчально-методичний посібник рекомендований студентам біологічних спеціальностей для практичних занять на курсі «Популяційна генетика», «Великому спеціальному практикумі» та при написанні кваліфікаційних робіт.

УДК 575.826:571.1:573.4(075.8)

ISBN 978-617-689-243-4

© Топтіков В. А., Єршова О. М., Ковтун О. О. та ін. 2017
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2017

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню
БФС – бромфеноловий синій
ДДС-Na (SDS) – додецилсульфат натрію (sodium dodecylsulfate)
ЕДТА – етилендіамінтетраацетат натрію
ЗАА – загальна антиоксидантна активність
МДА – малоновий діальдегід
МБА – метилен-*bis*-акриламід
МТТ – С1(4,5)-диметилтіазоліл-2іл-2,5дифенілтетразолійбромід
НТС – нітросиній тетразолій
ПАА – поліакриламід
ПААГ – поліакриламідний гель
СОД – супероксиддисмутаза
ТЕМЕД – тетраетил-етилендіамін
ТБК – тіобарбітурова кислота
ТХО – трихлороцтова кислота
ФАД – флавінаденіндинуклеотид
GSH – глутатіон відновлена форма
GSSG – глутатіон окиснена форма
NADH – нікотинаміддинуклеотид відновлена форма
NAD⁺ – нікотинаміддинуклеотид окиснена форма
NADPH – нікотинаміддинуклеотид фосфат відновлена форма
NADP⁺ – нікотинаміддинуклеотид фосфат окиснена форма



ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ.....	7
1.1. Підготовка біологічного матеріалу.....	8
1.2. Основні прилади та інструменти.....	8
1.3. Визначення супероксиддисмутазної активності.....	9
1.4. Визначення каталазної активності.....	10
1.5. Визначення глутатіонпероксидазної активності.....	11
1.6. Визначення глутатіонредуктазної активності.....	13
1.7. Визначення відновленого глутатіону.....	14
1.8. Визначення малонового діальдегіду.....	15
1.9. Визначення загальної антиоксидантної активності.....	16
2. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ.....	19
2.1. Сутність електрофорезу і основні способи електрофоретичного розділення білків.....	19
2.2. Основні умови приготування гелів.....	26
2.3. Підготовка зразків до електрофоретичного розділення.....	29
2.4. Диск-електрофорез у ПААГ кислих білків.....	32
2.5. Горизонтальний електрофорез у гелі агарози.....	35
2.6. Електрофорез лужних білків.....	38
2.7. Визначення молекулярної маси білків за допомогою електрофорезу	41
2.8. Візуалізація білкових фракцій на електрофореграмах.....	46
2.8.1. Візуалізація загальної картини розташування у гелях білків після електрофоретичного розділення.....	46
2.8.2. Диференціальне фарбування складних протеїнів.....	49
2.8.3. Ідентифікація ферментів.....	55
2.9. Візуалізація ферментів після SDS-електрофорезу.....	113
2.10. Аналіз електрофореграм.....	114
2.10.1. Основні показники електрофоретичного спектра та загальноприйнята номенклатура ізоформ.....	114
2.10.2. Документування і кількісний аналіз електрофореграм.....	117
2.10.3. Використання результатів електрофоретичного аналізу в генетиці.....	120
2.11. Деякі особливості роботи з тканинами рапани.....	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	134



ВСТУП

Генетичні, молекулярно-біологічні та біохімічні методи давно стали потужним інструментом у вивченні біологічних об'єктів різного рівня організації. Завдяки їм успішно вивчаються особливості функціонування внутрішньоклітинних структур, окремих тканин та організмів, закономірності розвитку популяцій, видів і т. д. У даному посібнику особлива увага приділяється проведенню досліджень на тканинах рапани. Це пов'язано з особливим статусом, який набув цей вид в екології не тільки Чорного моря, але й всього Світового океану.

Рапана є агресивним інвазійним об'єктом, який становить великий інтерес у зв'язку із значним її впливом на стан екосистем Чорного моря. Визначення цього впливу на природні угруповання потребує досконалого вивчення всіх її властивостей – генетичних, біохімічних, фізіологічних, поведінкових та екологічних. У першу чергу необхідно з'ясування тих особливостей, що визначають адаптивні властивості та межі мінливості молюска в різних умовах довкілля.

Якщо морфологія, анатомія, особливості онтогенезу рапани вивчені досить повно, то робіт по фізіології, біохімії та генетиці цього молюска вкрай мало. На сьогодні досить докладно визначена локалізація основних хімічних сполук в тканинах молюска та встановлено деякі загальні морфо-фізіологічні особливості функціонування різних органів і систем. Однак, більшість генетико-біохімічних аспектів діяльності цих систем практично не досліджувались. Головним чином визначають хімічний склад тіла молюска, розраховують накопичення сухої речовини, глікогену та енергії. Зазвичай ці дослідження пов'язані з оцінкою харчової якості м'яса рапани. Поодинокі дослідження присвячені філогенетичним аспектам вивчення цієї тварини. Дослідження цього напряму провадяться за допомогою ДНК-маркерів, а також з вивчення показників мушлі рапани.

Велике значення у формуванні адаптивних властивостей організмів мають антиоксидантна й прооксидантна системи та їх баланс. Для рапани властивості зазначених систем та їх функціонування за різних умов середовища практично не досліджувались. У зв'язку з цим в першому розділі даного посібника приділяється увага методикам вивчення різних компонентів анти- і прооксидантної систем органів рапани.

Мінливість є одною з найважливіших властивостей організмів, що забезпечують їх адаптацію в ході еволюції. Широта модифікаційної мінливості, рівень мутаційної мінливості і швидкість її закріплення в спадковості визначають можливості освоєння видом нових ареалів та його філогенез. Рапана володіє надзвичайною пристосованістю та пластичністю. На базі вивчення конхіологічних показників було показано, що цей черевоногий молюск може швидко утворювати нові форми. З іншого боку молекулярно-генетичний аналіз ДНК рапани показав, що її особини, які засвоїли нові віддалені ареали у світі, відносяться до одного виду *R. venosa* походженням з Чорного моря. З'ясування рівня генотипової однорідності сукупностей рапани з різних регіонів не є абстрактною проблемою. Рішення цього питання надає можливість науково-обґрунтовано прогнозувати її вплив на екосистеми, в які інтродукувала рапана, та можливості її подальшого розселення.

У даний час поряд з аналізом нуклеїнових кислот найважливішим способом отримання інформації про генотип є дослідження поліморфізму білків і, зокрема, ферментів. Кожен з названих підходів має свої переваги й недоліки. Методи, засновані на аналізі ДНК і РНК, дають пряму інформацію про структуру геному та рівень активності окремих генів, але не можуть надати дані про особливості взаємодії генів. Аналіз білкового поліморфізму відображає особливості функціонування геному в цілому та його окремих елементів, а також фенотипове вираження взаємодії генетичних детермінант. Білковий поліморфізм можна вивчати різними методами: хроматографічними, електрофоретичними, за допомогою ізофокусування та іншими способами. Другий розділ цього посібника присвячений методам електрофоретичного вивчення поліморфізму білків, ферментів зокрема.

У зв'язку з тим, що як генетичний, генетико-біохімічний та молекулярно-генетичний об'єкт рапана вивчена вкрай недостатньо, укладачі даного посібника вважали за необхідне викласти основні методи дослідження цього важливішого для сучасної екології Чорного моря молюска за вище зазначеними аспектами. Більшість наведених у посібнику методів було апробовано в ході експериментальних досліджень, проведених науковою тематичною групою молекулярної і біохімічної генетики Біотехнологічного науково-навчального центру ОНУ імені І. І. Мечникова.



1. ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ

Активні форми кисню (АФК) – це малі молекули, надзвичайно активні завдяки присутності в них неспарованих валентних електронів. В нормальних умовах у клітинах організму виробляється обмежена кількість АФК, які виконують важливу сигнальну та регуляторну функції.

Однак, завдяки патології та дії будь-яких, у тому числі несприятливих зовнішніх умов кількість АФК у клітинах може суттєво збільшитися. Разом з активними формами кисню утворюються й інші активні радикали (пероксиди, епоксиди, альдегіди, кетони, спирти, діальдегіди та ін.), які здатні ковалентно взаємодіяти з окремими функціональними групами білків, що приводить до їх полімеризації та руйнування амінокислотних залишків, особливо тих, які містять SH- і SCH₃-групи цистеїну, метіоніну, NH-групи лізину тощо. Усе це може викликати модифікацію білків, у тому числі ферментів, та зміну їх активності, а також зміну та руйнування структурних і функціональних властивостей мембран. Аналогічні явища спостерігаються й у структурі ДНК пошкоджених клітин. Вільні радикали можуть взаємодіяти як безпосередньо з азотистими основами ДНК, так і опосередковано, через вторинні та кінцеві продукти перекисного окиснення ліпідів (малоновий діальдегід та його похідні), які можуть зв'язуватися з ДНК та білками ядерного хроматину, призводячи до спотворення процесів зчитування генетичної інформації - реплікації та транскрипції.

Шкідливій дії вільних радикалів і АФК протистоїть антиоксидантна система. К. Девис [1987] запропонував класифікацію антиоксидантних систем захисту організму, які включають первинну та вторинну системи захисту.

До первинної системи входять:

1) антиоксидантні сполуки, що здатні нейтралізувати активні радикали і/або зменшувати інтенсивність вільнорадикального окиснення (вітаміни Е, А, С, глутатіон, сечова кислота та ін.);

2) ферменти, що утилізують АФК (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза та ін.).

Вторинна система включає ферменти розщеплення жирів (фосфоліпази), протеолітичні ферменти (протеїнази, пептидази) та ферменти репарації ДНК (ендонуклеази, екзонуклеази, лігази).

Ферменти первинної антиоксидантної системи стоять на першій лінії захисту організму від шкідливої дії вільних радикалів.

Неферментні антиоксидантні сполуки поділяють на макромолекулярні та низькомолекулярні. Макромолекулярні антиоксидантні сполуки – це білки, що беруть участь у транспорті та зв'язуванні іонів металів із змінною валентністю (заліза, міді, селену, кобальту): трансферин, феритин, церулоплазмін, гаптоглобін, транскобаламін). Низькомолекулярні антиоксидантні сполуки поділяють на дві групи. До першої відносяться жиророзчинні (або «істинні») антиоксиданти, які спроможні інактивувати вільні радикали: токофероли, вітаміни Е і А, каротиноїди, убіхінон, вітаміни групи К, фосфоліпіди, стероїдні гормони та ін. Компоненти другої групи низькомолекулярних антиоксидантів виконують допоміжну роль, у тому числі відновлюють істинні антиоксиданти. Це – глутатіон, вітамін С, карнозин, сечова кислота та ін.

1.1. Підготовка біологічного матеріалу

В якості прикладу описано отримання гомогенату з тканини лейблейнівської (стравохідної) залози рапани. Дослідну тканину зважували й ретельно розтирали в охолодженій порцеляновій ступці або гомогенізаторі з невеликою кількістю фізіологічного розчину – 0,9 % NaCl – (до 2 мл). Отриманий гомогенат розводили такою кількістю фізіологічного розчину, щоб відношення маси тканини у мг до об'єму розчину в мл складало 1 : 11. Наприкінці гомогенат центрифугували 10 хв при 10000 обертів на хвилину.

Отриманий препарат без/або після додаткової обробки може бути використаний для дослідження різних компонентів антиоксидантної системи. Так, для визначення супероксиддисмутазної активності необхідна часткова очистка гомогенату (див. 1.3). При вивченні деяких інших компонентів антиоксидантної системи здійснюється додаткове розведення гомогенату.

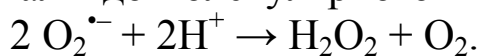
1.2. Основні прилади та інструменти

- набір для препарування м'якого тіла рапани (скальпелі, ножиці, пінцети),
- ваги (з точністю 0,01 г)

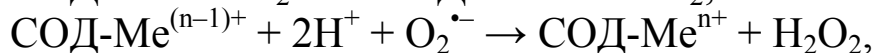
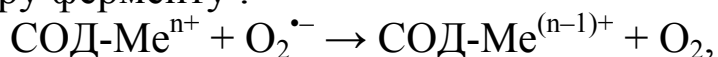
- порцелянова ступка з товкачиком,
- гомогенізатор,
- настільна центрифуга до 8000 об/хв. типу ОПН-8УХЛ4.2,
- настільна центрифуга для епендорфних пробірок типу *miniSpid*,
- холодильник,
- спектрофотометр.

1.3. Визначення супероксиддисмутазної активності

СОД каталізує диспропорціювання супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню і пероксиду водню:



Механізм дії СОД полягає в послідовному відновленні і окисненні супероксидними аніон-радикалами металу (Me) активного центру ферменту :



де Me – іон металу.

Дисмутація супероксидних аніонів може відбуватися і без участі СОД, але в присутності ферменту цей процес йде швидше в десять тисяч разів.

Принцип методу. Визначення активності СОД здійснюється шляхом спостереження за аутоокисненням адреналіну й засноване на вимірюванні оптичного поглинання продукту окиснення при 347 нм. Утворення окисненого адреналіну відбувається в присутності спонтанно виникаючих супероксидних радикалів $\text{O}_2^{\bullet -}$. За рахунок знищення супероксиддисмутазою радикалів кисню зменшується ступінь аутоокиснення адреналіну, в результаті чого у присутності СОД знижується оптичне поглинання реакційної суміші порівняно з пробою, що не містить ферменту.

Реактиви. 0,1% (5,46 мМ) аптечний розчин адреналіну, фізіологічний розчин (0,9 % розчин NaCl), 0,2 М бікарбонатний буфер, рН 10,5. Бікарбонатний буфер готують, додаючи до 0,1 М розчину Na_2CO_3 0,1 М розчин NaHCO_3 у співвідношенні 4 : 1.

Часткова очистка препарату. До 1 мл гомогенату додавали 390 мг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60% насичення), ретельно перемішували і повністю розчиняли сульфат амонію. Залишали на добу у холодильнику для формування осаду. Центрифугували при 8000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант зливали, а осад розчиняли у 50 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7, доводячи до початкового об'єму гомогенату (1мл) і ретельно перемішували.

Хід визначення. Контрольна проба: до 2 мл бікарбонатного буферу додавали 100 мкл 0,1% розчину адреналіну, ретельно і швидко перемішували, відразу і через 3 хв реєстрували на спектрофотометрі величину оптичної щільності при довжині хвилі 347 нм. Дослідна проба: послідовно додавали 2 мл буферу, 50 мкл досліджуваного ферментного препарату і потім 100 мкл 0,1% розчину адреналіну. Перемішували і вимірювали зростання оптичної щільності як описано вище.

Розрахунок активності

1) Вимірювали зростання оптичної щільності за 3 хв в контрольній пробі.

2) Визначали зміну оптичної щільності ферментного препарату за 3 хв у дослідній пробі.

3) Знаходили різницю між контрольною і дослідною пробами (А).

4) Обчислювали активність СОД: $X = (A \times P \times V) / T$,

де X – ферментативна активність в 1 мл пробі в одиницях оптичної щільності на 1 г тканини / хв,

A – різниця між контролем і дослідною пробою,

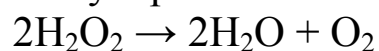
P – коефіцієнт врахування обсягу ферментного препарату (2),

V – розведення ферментного препарату (в 11 разів),

T – час реакції (3 хв).

1.4. Визначення каталазної активності

Каталаза – це фермент, який каталізує розкладання пероксиду водню (H_2O_2) на воду і молекулярний кисень:



Фермент дуже поширений у клітинах тварин, рослин і мікроорганізмів. Відноситься до хромопротеїдів, що мають в якості простетичної (небілкової) групи гем. Специфічність каталази

відносно до субстрату-відновника невелика, тому вона може каталізувати не тільки розкладання H_2O_2 , але й окиснення нижчих спиртів і нітритів.

Принцип методу. Каталітична активність визначається зменшенням вмісту H_2O_2 в досліджуваній пробі. Кількість пероксиду встановлюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 240 нм.

Реактиви

1. 50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,0;
2. 50% H_2O_2 ;
3. 0,9% водний розчин NaCl.

Хід визначення. У кювету спектрофотометра додають 2,0 мл інкубаційного середовища, який містить буфер і 50% H_2O_2 до кінцевої концентрації 10 мМ. Вимірюють величину оптичної щільності розчину проти контролю, в якості якого використовують фосфатний буфер. Потім до проб додають 0,2 мл гомогенату, що містить каталазу. Проби перемішують і вимірюють оптичну щільність протягом 3 хв.

Розрахунок активності здійснюють за формулою:

$$A = \Delta E \times V_1 \times P_1 \times P_2 / (43,6 \times T \times V_2),$$

де A – каталазна активність у мМ H_2O_2 / г тканини за хвилину,

ΔE – різниця між початковим і кінцевим значеннями оптичної щільності,

V_1 – загальний обсяг реакційного середовища в кюветі (2,2 мл),

P_1 – розведення тканини під час приготування гомогенату (11 разів),

P_2 – розведення гомогенату при визначенні активності (50 разів),

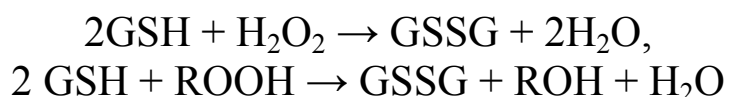
43,6 – коефіцієнт молярної екстинкції пероксиду водню,

T – час реакції (3 хв),

V_2 – обсяг ферментного препарату, що додається в кювету (0,2 мл).

1.5. Визначення глутатіонпероксидазної активності

Глутатіонпероксидаза каталізує відновлення перекисів ліпідів у відповідні спирти і відновлення пероксиду водню до води:



В якості донора водню цей фермент використовує глутатіон (GSH), який при цьому окиснюється до дисульфіду глутатіону (GSSG). Фермент глутатіонредуктаза далі за допомогою нікотинаміддинуклеотидфосфату відновлює окиснений глутатіон і завершує цикл:



Так само як і каталаза, глутатіонпероксидаза здатна руйнувати пероксид водню, але вона більш чутлива до низьких концентрацій H_2O_2 , які утворюються частіше. У деяких тканинах (клітини мозку, серце) каталази майже немає, тому глутатіонпероксидаза грає там роль основного антиоксидантного ферменту.

Принцип методу. Глутатіонпероксидазну активність визначали по зменшенню вмісту NADPH, який витрачається на відновлення окисненого глутатіону у досліджуваній пробі. Реакція проводиться у присутності глутатіонредуктази, яка є у гомогенаті. Визначення проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.

Реактиви:

1. 50 мМ калій-фосфатний буфер рН 7,0;
2. глутатіон відновлений;
3. 50% H_2O_2 ;
4. NaN_3 ;
5. відновлений нікотинаміддинуклеотидфосфат;
6. ЕДТА.

Хід визначення. У кювету спектрофотометра додавали 2,0 мл інкубаційного середовища і вимірювали величину оптичної щільності розчину проти контролю, яким слугував фосфатний буфер. Потім до проб додавали 25 мкл гомогенату, що містить глутатіонпероксидазу, проби перемішували і вимірювали зменшення оптичної щільності протягом 3 хв.

Інкубаційне середовище готували на калій-фосфатному буфері з доданням реагентів у наступних концентраціях (мМ):

відновлений глутатіон	0,85,
відновлений NADPH.....	0,15,
NaN_3	3,00,

ЕДТА1,00,
Н₂О₂0,30.

Розрахунок активності здійснюють за формулою:

$$A = \Delta E \times 1000 \times 1000 \times V_1 \times P / (6,22 \times 1000 \times T \times V_2),$$

де А – активність ферменту в нМ / хв на г тканини,

ΔЕ – різниця початкової і кінцевої оптичної щільності;

V₁ – загальний обсяг реакційного середовища в кюветі (2 мл);

Р – розведення тканини при приготуванні гомогенату (у 11 разів);

6,22 – коефіцієнт молярної екстинкції відновленого NADPH;

T – час реакції (3 хв);

V₂ – об'єм ферментного препарату, що додається в кювету (0,025 мл).

1.6. Визначення глутатіонредуктазної активності

Глутатіонредуктаза – фермент, який відновлює дисульфідні зв'язки окисненого глутатіону (GSSG) до його сульфгідрильної форми GSH за схемою:



Принцип методу. Активність ферменту визначали по зменшенню вмісту відновленого нікотинаміддинуклеотидфосфату в досліджуваній пробі. Визначення проводили на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.

Реактиви:

- 1) 7,5 мМ розчин окисненого глутатіону;
- 2) 6,0 мМ розчин відновленого нікотинаміддинуклеотидфосфату;
- 3) 0,067 М фосфатний буфер, рН 6,6.

Хід визначення. У кювету спектрофотометра наливали 2,0 мл інкубаційного середовища і вимірювали величину оптичної щільності розчину проти контролю, яким слугував фосфатний буфер. Потім до проб додавали 0,05 мл гомогенату, що містить глутатіонредуктазу. Проби перемішували й вимірювали зменшення оптичної щільності протягом 2 хв.

Інкубаційне середовище готували на фосфатному буфері з доданням реагентів у наступних концентраціях (мкМ):

Окиснений глутатіон 0,075,
Відновлений NADPH 0,063.

Розрахунок активності здійснюють за формулою:

$$A = \Delta E \times V_1 \times P / (6,22 \times T \times V_2),$$

де А – активність глутатіонредуктази у мкМ NADPH / хв на г тканини,

ΔE – різниця початкової і кінцевої оптичної щільності,

V_1 – загальний обсяг реакційного середовища в кюветі (2 мл),

P – розведення тканини при приготуванні гомогенату (у 11 разів),

6,22 – коефіцієнт молярної екстинкції відновленого НАДФ,

T – час реакції (2 хв),

V_2 – об'єм ферментного препарату, який додавали в кювету (0,050 мл).

1.7. Визначення відновленого глутатіону

Глутатіон є центральною ланкою антиоксидантної системи майже всіх клітин і органів. Його власна антиоксидантна дія пов'язана з відновленням сульфгідрильних груп. Завдяки цьому він захищає клітину від вільних радикалів та визначає окислювально-відновлювальний потенціал внутрішньоклітинного середовища. Крім того, глутатіон відновлений є основним субстратом важливішого антиоксидантного ензиму – глутатіонпероксидази.

Принцип методу. Відновлений глутатіон при взаємодії з реактивом Елмана (5,5-дітіобіс-2-нітробензойна кислота) утворює сполуку (2-нітро-6-меркаптобензойну кислоту) жовтого кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту глутатіону.

Реактиви

1. Реактив-осаджувач. У мірній склянці розчиняли послідовно в невеликому обсязі дистильованої води: крижану метафосфорну кислоту – 6,68 г, ЕДТА – 0,80 г, хлористий натрій – 120,00 г. Доводили об'єм дистильованою водою до 400 мл.

2. 0,3 М розчин Na_2HPO_4 .

3. Реактив Елмана – 0,05% розчин 5,5-дітіобіс-2-нітробензойної кислоти в 1% розчині 3-х заміщеного цитрату натрію.

4. Стандартний розчин відновленого глутатіону – 5 мМ. З нього шляхом розведення готували декілька робочих розчинів: 0,01 мМ; 0,02 мМ; 0,05 мМ; 0,10 мМ; 0,20 мМ; 0,50 мМ; 1,00 мМ; 2,00 мМ; 5,00 мМ.

Таблиця 1

Хід визначення відновленого глутатіону

Інгредієнти	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл	Проба для побудови калібрувальної кривої, мл
Гомогенат тканини (1:10)	0,50	–	–
Реактив для осадження	0,75	0,75	0,75
Фізіологічний розчин	–	0,50	–
Стандартний розчин відновленого глутатіону	–	–	0,50
0,3 М Na ₂ HPO ₄	2,00	2,00	
Реактив Елмана	0,10	0,10	

Через 5 хв на спектрофотометрі в кюветі (10 мм) вимірювали оптичну щільність дослідної проби проти контрольної при довжині хвилі 412 нм. **Розрахунок кількості** відновленого глутатіону проводили на підставі отриманої калібрувальної кривої. Результати перераховували на грам тканини.

1.8. Визначення малонового діальдегіду

Малоновий діальдегід (МДА) – CH₂(СНО)₂ – виникає в організмі при деградації поліненасичених жирів активними формами кисню. Він служить маркером перекисного окиснення жирів (у тому числі і при дії випромінювання) та оксидативного стресу. Показано, що МДА здатний реагувати з ДНК, утворюючи ДНК-аддукти, в тому числі мутагенні.

Малоновий діальдегід має настільки реакційноздатні метиленові групи, що ця сполука не може бути виділена у вільному стані, оскільки вона негайно зазнає кретонову конденсацію з утворенням похідних бензолу.

Принцип методу. При високій температурі в кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом оптичного поглинання при 532 нм. Молярний коефіцієнт екстинкції цього комплексу – $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$.

Реактиви

1. 17% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО).
2. 0,8% водний розчин 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК).
3. 0,9% розчин NaCl.

Хід визначення. 1 мл гомогенату у фізіологічному розчині поміщали в центрифужні пробірки і осаджали білок додаванням 0,5 мл 17% розчину ТХО. Утворений осад відокремлювали центрифугуванням протягом 10 хв при 8000 об / хв. Відбирали 1 мл надосадової рідини, переносили у скляні пробірки, додавали 1 мл 0,8% водного розчину ТБК і поміщали проби на 10 хвилин у киплячу водяну баню. В якості контролю використовували проби, що містять замість надосадової рідини фізіологічний розчин. Після розвитку рожевого забарвлення проби охолоджували до кімнатної температури і вимірювали оптичну щільність при 532 нм проти контрольної проби.

Кількість малонового діальдегіду розраховують за формулою:

$$\text{МДА} = E \times V \times P / 0,156,$$

де МДА – кількість діальдегіду у нМ / г тканини,

E – екстинція;

V – об'єм реакційного середовища в кюветі (2 мл);

P – розведення гомогенату (в 11 разів).

1.9. Визначення загальної антиоксидантної активності

Спосіб I – з використанням твінів.

Принцип методу. Загальну антиоксидантну активність (ЗАА) оцінювали по ступеню інгібування окиснення твіну-85 до МДА. Окиснення твіну індукується сумішшю аскорбінової кислоти та іонами заліза.

Реактиви

1. 1% водний розчин твіну-85.
2. 1 мМ водний розчин сульфату заліза.
3. 10 мМ водний розчин аскорбінової кислоти.
4. 40% водний розчин трихлороцтової кислоти (ТХО).
5. 0,25% водний розчин тіобарбітурової кислоти (ТБК).

Хід визначення. В склянки з темного скла (для дослідних і контрольних проб) з притертими пробками об'ємом 10 мл додавали 2 мл твіну-85, 0,2 мл розчину сульфату заліза, 0,2 мл розчину аскорбінової кислоти і 0,05 мл гомогенату тканини. В залежності від активності об'єм проби може коливатися від 0,05 до 0,20 мл. В контрольну пробу замість біологічного матеріалу додавали відповідну кількість дистильованої води. Інкубували 48 годин при 40 °С. Потім до 2 мл суміші додавали 1 мл ТХО, через 60 хв центрифугували при 8000 об / хв протягом 15 хвилин. Після центрифугування 1 мл надосадової рідини переносили у скляні пробірки, додавали 2 мл розчину ТБК та витримували в киплячій водяній бані 15 хв. Охолоджували та колориметрували на спектрофотометрі при довжині хвилі 532 нм у кварцевій кюветі завширшки 10 мм. Нуль виставляли проти дистильованої води.

Розрахунок результатів проводили за формулою:

$$\text{ЗАА (\%)} = (E_K - E_O) / E_K \times 100,$$

де ЗАА – загальна антиоксидантна активність у %,

E_K і E_O – екстинція контрольної та дослідної проб відповідно.

Спосіб II – з використанням ліпопротеїнів яєчного жовтка.

Принцип методу. ЗАА оцінювали за ступенем інгібування окиснення ліпопротеїнів до МДА. Окиснення ліпопротеїнів індукується іонами заліза.

Для приготування модельної системи з курячого яйця виділяли жовток, підсушували його на фільтрувальному папері, потім розчиняли в рівному об'ємі фосфатного буферу (40 мМ KH_2PO_4 + 105 мМ KCl , рН 7,5). Отриману суспензію перед використанням розводили в 25 разів тим же буфером. Суспензію можна зберігати при 40 °С протягом тижня.

Хід визначення

До 0,5 мл досліджуваного зразка (гомогенату тканини) додавали 1 мл суспензії ліпопротеїнів яєчного жовтка, потім 3 мл ортофосфорної кислоти (рН 2,0). Перекисне окиснення ініціювали доданням 0,1 мл сірчаноокислого заліза (30 мг $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у 10 мл дистильованої води). Контрольна проба не містила досліджуваного зразку, замість якого додавали дистильовану воду. Проби ретельно перемішували та інкубували у термостаті на водяній бані при 37 °С протягом 20 хв.

Швидкість перекисного окиснення ліпідів визначали за кількістю МДА (див. 1.7).

ЗАА досліджуваного зразку **розраховували** за формулою:

$$\text{ЗАА} = (\text{E}_\text{К} - \text{E}_\text{О}) / \text{E}_\text{К} \times 100,$$

де ЗАА – загальна антиоксидантна активність досліджуваного зразку в %,

$\text{E}_\text{К}$ и $\text{E}_\text{О}$ – оптична щільність контрольної та дослідної проб відповідно.



2. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ

2.1. Сутність електрофорезу і основні способи електрофоретичного розділення білків

Для більш докладного ознайомлення з принципами і засобами електрофоретичного розподілу білків рекомендуємо книгу Л. А. Остермана [1981], а також інші монографії [Гааль и др., 1982; Маурер, 1984; Manchenko, 2003].

Макромолекули білка, що знаходяться в буферному розчині мають певний сумарний електричний заряд. Величина та знак заряду залежать в першу чергу від pH середовища, в якому розчинені макромолекули, а також від присутності в буфері сполук, які здатні реагувати з певними групами молекули білка і тим самим змінювати її сумарний заряд. Якщо через буферний розчин пропускати електричний струм, то під впливом електричного поля молекули білків почнуть рухатися до катода або анода відповідно до свого сумарного електричного заряду. Рухливість білкових молекул у вільній рідині визначається співвідношенням сумарного заряду молекули до її маси. Швидкість цього руху буде стримуватися через тертя молекул білка із середовищем. Сила тертя залежить від форми і розмірів молекул білка (тобто від співвідношення лінійних розмірів макромолекул) та механічної щільності середовища (тобто від сили зв'язків між молекулами середовища, розмірів пропускних каналів у ньому та ін.).

У результаті вищезазначених факторів різні групи білкових молекул будуть рухатися із своєю швидкістю і наприкінці розділяться на зони однакових молекул, які мігрували з однією швидкістю. У цьому складається сутність процесу електрофорезу.

Виходячи з того, що заряд білків залежить від pH середовища, застосовують ту чи іншу буферну систему, в якій буде провадитися розділення білків. Для кислих білків (з перевагою в молекулі кислотних залишків) використовують лужні або слабколужні буфери, для лужних білків – кислі.

Напруженість електричного поля за електрофорезу не повинна перевищувати значення 10–20 В/см. Як показує практика, збільшення напруженості призводить до погіршення якості розділення.

Середовище, де рухаються макромолекули білків, заповнюють різноманітними носіями, які утримують рідке середовище від

витікання та заважають дифузії молекул білка. У сучасній дослідницькій практиці для аналітичного та препаративного розділення білків майже виключно використовуються гелі поліакриламідну, а також гелі агарози, крохмалю чи суміш ПААГ + агароза.

Застосовують гелі двох геометричних форм: циліндричної і пластинчастої. Відповідно до цього користуються спеціальними шаблонами (формами), які виготовляють із скла або плексигласу: трубочки або роз'ємні шаблони з двох пластин. У ці форми наливають рідкий розчин, який потім полімеризується у твердий гель. Зрозуміло, що необхідно забезпечити надійну герметизацію шаблонів, щоб запобігти витіканню розчину до його перетворення у твердий стан. Це відповідальний момент у процесі виготовлення гелю, коли необхідно бути акуратним та уважним. Існує дуже багато різних конструкцій приладів для електрофорезу, розглядати яких немає можливості та сенсу. Перед практичним застосуванням того чи іншого конкретного апарата потрібно досконало вивчити інструкції до нього.

Більшість індивідуальних білків мають молекулярну масу не вище 500 кД, тому електрофоретичний розподіл білків провадять, як правило, у поліакриламідному гелі з концентрацією від 5 до 20%. Для загального аналізу білків крові найбільш придатними є гелі ПАА у концентрації 7,5–10%. Якщо метою розподілу є фракціонування білків тільки за відношенням електричного заряду до маси молекул, використовують гелі агарози у діапазоні концентрацій від 0,4% до 2%.

Відомі різні принципові варіанти електрофоретичного методу розділення білків, деякі з них кратко представлені нижче.

Електрофорез у безперервній (простій) системі. Сутність способу полягає в тому, що в якості електродних буферів та розчинів для полімеризації ПААГ використовують один і той же буфер. Дане визначення є не зовсім точним, оскільки безперервність порушується тим, що розчин, в якому вносять досліджуваний матеріал, може за своїм складом відрізнитись від електродного буферу або бути розбавленим водою. Це робиться для того, щоб сконцентрувати вихідну зону препарату білків.

За умов безперервної системи здійснюється достатньо ефективно розділення білкових фракцій. Але у багатьох випадках

використовувати цей метод для конкретної характеристики білків неможливо. Справа у тому, що у простій системі електрофоретична рухливість молекул білка залежить одночасно від багатьох факторів: сумарного заряду молекули, молекулярної маси, конфігурації молекули, жорсткості пакування поліпептидного ланцюга. Внесок же кожного чинника оцінити дуже важко.

Електрофорез у переривчастій системі (диск-електрофорез, ступінчастий електрофорез). Дана система характеризується наступними особливостями.

1) Наявність двох шарів гелю: «формуючого» («що концентрує»), у якій вносять зразки білка, і після нього – «робочого» («поділяючого») гелю. Ці два шари відрізняються розміром пор, а також значенням pH і концентрацією реагентів у буфері. «Формуючий» гель – великопористий, pH його ближче до нейтрального, молярність – більш низька. «Робочий» гель – дрібнопористий, pH – різко лужний (для фракціонування кислих білків), або більш кислий (для розділення лужних форм), ніж формуючий гель. Крім того, концентрація компонентів його буфера значно вище, ніж у формуючому гелі. Призначення формуючого гелю – зібрати суміш всіх фракцій білків в одну вузьку смугу, тобто сконцентрувати препарат до його розподілу в робочому гелі. Призначення робочого гелю – фракціонувати різні форми білків.

2) У складі робочого буфера обов'язковою є присутність швидкорухомих іонів, які мігрують у тому ж напрямку, що і білки: наприклад, Cl^- (для лужних буферів), K^+ – (для кислих). Головна ознака цих іонів полягає у тому, що швидкість їх руху у електричному полі не залежить від pH розчину.

3) Буфер, який контактує з препаратом білка («верхній» буфер), відрізняється за складом pH та молярністю від решти буферів. Обов'язковий його компонент – іон, який мігрує у тому ж напрямку, як і білки. При цьому він повинен змінювати свою рухливість в залежності від значення pH : у формуючому гелі його рухливість повинна бути мінімальною, у робочому гелі – максимальною. Звичайно для цієї мети використовують амінокислоти, які за своєю природою є цвіттеріонами (гліцин, або β -аланін).

Диск-електрофорез має високу здатність фракціонувати молекули, але як й у простій системі, розподіл білків на електрофореграмах також залежить від багатьох факторів.

Для того, щоб мати можливість отримати конкретну характеристику білкової фракції, застосовують різні модифіковані варіанти.

Електрофорез у присутності детергентів. Введення того чи іншого детергенту у електрофоретичну систему дозволяє значно змінити характер розділення досліджуваних білків і розширити спроможності методу. Найчастіше при електрофорезі білків використовують такі сполуки, як сечовина, Тритон X-100 та додецилсульфат натрію.

Сечовина і Тритон X-100 – це неіонні детергенти. Їх використовують в першу чергу для розчинення гідрофобних білків, які важко розчиняються у водному середовищі, а також для запобігання агрегації молекул у ході електрофорезу і формування осаду. До таких білків відносяться гістони, рибосомні, мембранозв'язані та інші. Оскільки неіонні детергенти не здатні переміщуватися в електричному полі, їх додають тільки у робочий буфер гелю та у вихідний препарат білка.

Сечовина може значно змінити конфігурацію білкової молекули і, як наслідок цього, вплинути на її рухливість впродовж електрофорезу. Однак, слід пам'ятати, що у концентрованих розчинах сечовини може відбутися, хоч і зворотна, денатурація білків, що може знизити чи зовсім знищити ферментну активність білка.

На відміну від сечовини Тритон X-100 не тягне за собою денатурацію білків, в його розчинах зберігається вторинна та третинна структури молекул і часто їх біологічна активність. Крім того Тритон X-100 утворює комплекси з гідрофобними ділянками молекули білка. Чим більша довжина цих ділянок, тим більше молекул детергенту зв'яжеться з молекулою білка, тим більшою буде ефективна молекулярна маса білка (молекулярна маса Тритону X-100 достатньо велика – 632 Д). Виникнення таких комплексів може збільшити масу молекул певного білка на тисячу і навіть десятки тисяч Дальтон, що можна виявити електрофорезом. Таким чином, формування комплексів з Тритоном X-100 можна використати для фракціонування білків.

Сечовину і Тритон X-100 можна застосовувати як у лужному, так і у кислому середовищах.

Використання ДДС-*Na* дозволяє виключити багато факторів, які впливають на електрофоретичну рухливість білків, та фракціонувати їх у залежності тільки від одного чинника – молекулярної маси молекул. Саме тому електрофорез у присутності ДДС-*Na* застосовують для визначення молекулярних мас білків.

Додецилсульфат натрію здатен приблизно однаково зв'язуватися з різними поліпептидними ланцюгами. За концентрації ДДС-*Na* вище 0,8 мМ кількість детергенту, зв'язаного з одиницею маси білків, є константною і складає 1,4 г ДДС-*Na* на 1 г білка. Цей зв'язок здійснюється за рахунок гідрофобних взаємодій, в результаті чого дисоційовані залишки сульфокислоти детергенту приносять негативний заряд у молекулу білка, значення якого пропорційно довжині поліпептидного ланцюга. Власний заряд білкової молекули за даних умов стає несуттєвим. Сталість співвідношення «детергент / білок» веде до того, що стає практично константним співвідношення «негативний заряд молекули білка / маса молекули білка». Крім того, електростатичне відштовхування заряджених залишків сульфокислоти детергенту спрямляє молекулу білка, завдяки чому молекула здобуває форму жорсткого еліпсоїду з діаметром 1,6 нм. Розміри довгої осі залежать від кількості залишків амінокислот у білку, тобто його молекулярній маси. У результаті електрофоретична рухливість комплексу детергент-білок пов'язана з молекулярною масою білка простою логарифмічною залежністю. Молекулярну масу невідомого білка знаходять з прямої графіку залежності відносної електрофоретичної рухомості білкових стандартів (для яких відома молекулярна маса) від логарифму значення молекулярної маси цих стандартів.

Вищезазначене обговорення є справедливим у випадку відсутності у білку дисульфідних містків та розгалужень. Тому, одночасно з обробкою детергентом, необхідно забезпечити повну денатурацію білка і руйнування *S-S*-зв'язків. Для цього препарат білка обробляють при підвищеній температурі (звичайно кип'ятіння) з великою концентрацією β -меркаптоетанолу. Для більшості білків цього буває достатнім для більш-менш точного визначення молекулярної маси. Зрозуміло, що за даних умов білок втрачає, як правило, біологічну активність (особливо ферментну).

Однак, у деяких випадках спроможності точного визначення молекулярної маси даним способом можуть бути обмежені. Це спостерігається у випадках 1) глікопротеїнів, 2) білків, які мають

ненормальну високу кількість гідрофільних амінокислот, 3) білків з особливим розподілом зарядів у поліпептидному ланцюзі.

Оскільки зв'язок ДДС-*Na* з будь-якими білками веде до формування кислих комплексів, електрофорез у присутності цього детергенту провадять у лужній буферній системі.

За використання ДДС-*Na* слід пам'ятати, що зазначений детергент значно пригнічує, або навіть повністю інгібує ферментну активність. Зворотність цього явища залежить від особливостей досліджуваного ферменту.

Електрофорез у гелях ПАА з градієнтом пористості. У даній системі використовують гель, в якому уздовж напрямку руху білка, поступово зростає концентрація акриламідну, тобто зменшуються розміри пор. Готування таких гелів більш складне, ніж звичайних. Для цього потрібні спеціальні прилади, однак, переваги даної системи визначають її широке розповсюдження.

Розподіл білкових фракцій у градієнтному ПААГ залежить тільки від співвідношення розмірів білків і характеру градієнту пористості, тобто розділення йде тільки за розмірами молекул. Для даної системи не мають принципового значення склад буферу, електричний режим процесу, об'єм білкового зразка. Електрофорез у поліакриламідних гелях з градієнтом пористості дозволяє отримати максимально можливе звуження білкових зон, тому дана система має дуже високу роздільну здатність.

У межах цього варіанту електрофорезу запропоновано спосіб визначення молекулярної маси білків по кінетиці їх міграції у лінійному градієнті концентрації поліакриламідну. Особлива риса цього підходу – збереження нативності досліджуваних білків.

Слід звернути увагу на те, що електрофорез у градієнті пористості ПААГ є придатним для розділення білків за їх розміром. У випадку фракціонування за зарядом градієнт концентрації акриламідну може тільки погіршити результат. Справа у тому, що білки з різним зарядом, але однакові за розміром, можуть зупинитися в одному й тому ж місці, тобто різні білки можуть опинитися в одній зоні.

Двомірний електрофорез. Повністю розділити різні білки вдається не завжди: достатньо часто в одну й ту ж електрофоретичну фракцію може потрапити декілька білків з неоднаковими властивостями. У таких випадках кожену фракцію, яка була отримана

після першого розділення (так званий «перший напрямок»), використовують в якості вихідного препарату для розділення в іншій системі (так званий «другий напрямок»). На останнє слід звернути особливу увагу. Кінцевий результат і сенс двомірного електрофорезу полягає саме в тому, щоб провадити перше і друге фракціонування за різними принципами розподілу. Застосування в обох напрямках однакової системи не дасть очікуваного особливого ефекту і може навіть погіршити результат.

В якості вихідного препарату для другого напрямку можна використати як окрему фракцію, так і весь спектр білкових фракцій, що були отримані після першого етапу розділення.

Існують різноманітні системи двомірного розділення білків. Їх вибір залежить від особливостей білків, які потрібно розділити. Наприклад, в якості першого напрямку білки фракціонують за зарядом (у крупнопористому гелі), в другому напрямку розділяють за розмірами молекул. Можливі різні комбінації різноманітних електрофоретичних систем.

Двомірне розділення білків не обмежується сполученням тільки електрофоретичних методів. Можна з електрофорезом комбінувати принципово інші методи розділення: хроматографію, електрофокусування, ізотахофорез, імуноелектрофорез та ін. Добре відома система О'Фаррела, де для першого напрямку розділення застосовується електрофокусування, для другого – диск-електрофорез у градієнті пористості ПААГ з ДДС-*Na*. Даний метод дуже добре зарекомендував себе для фракціонування кислих білків.

Моніторинг процесу електрофорезу. Як правило, рух білків при електрофорезі не є наявним без застосування спеціальних приладів. Для спостереження за ходом електрофорезу та щоб не загубити деякі білкові фракції (які можуть вийти у електродний буфер), у вихідний препарат білка додається барвник – «лідуючий» барвник. Вимоги до цього барвника наступні:

- 1) повинен рухатися в тому ж напрямку, що і поділювані білки,
- 2) не повинний помітно зв'язуватися з білками,
- 3) швидкість його руху повинна бути значно більшою, ніж у самих швидких білків, але при цьому барвник не повинен занадто відриватися від білків (для більш ефективного використання довжини гелю).

У лужних і нейтральних буферах, а також у системах з використанням ДДС-*Na* застосовують кислі барвники, тобто негативно заряджені сполуки. Частіше всього користуються бромфеноловим синім (БФС). За фракціонування великих білків в якості лідируючого барвника беруть ксиленціанол, якій має рухливість удвічі меншу, ніж БФС.

При електрофорезі в кислому середовищі застосовують лужні барвники, які при дисоціації формують позитивно заряджені пофарбовані іони: метиловий зелений, метиловий синій, піронин Y та інші.

Моніторинг електричних параметрів системи ведуть, як правило, контролюючи і підтримуючи постійну силу електричного струму, хоча можливі й інші варіанти. Звичайно немає необхідності змінювати електродні буфери, але слід звертати увагу на їх об'єм та *pH*, особливо в тих випадках, коли спостерігаються певні аномалії проходження електрофорезу та стану гелів.

2.2. Основні умови приготування гелів

Деякі моменти техніки приготування гелів

Дуже важлива умова – чистота поверхні скляних або пластмасових форм для гелю. Пластини або трубки, які застосовують в якості шаблонів для гелів, повинні бути знежиреними, дуже добре обполісканими дистильованою водою. Під час миття не можна використовувати засоби (йоржики та інші жорсткі пристрої), які пошкоджують (дряпають) поверхню скла.

При використанні вертикально розташованих пластин відстань між ними (тобто товщина гелю) задається за допомогою спеціальних прокладок – «спейсерів». Їх виготовляють з тефлону або плексигласу. Частіше за все застосовують прокладки товщиною 1 мм. Тефлонові прокладки можна не змазувати, але плексигласові обов'язково обробляють силіконовою змазкою або медичним вазеліном. При цьому необхідно наносити якомога тонкіший шар змазки, який не повинен видавлюватись у простір між пластинами.

Плоскі гелі прямокутної форми (вертикальні або горизонтальні) дозволяють одночасно розділяти в приблизно однакових умовах багато зразків. Для внесення препаратів у такі гелі формують спеціальні «кишені» або «криниці». Для цього в рідкий

розчин до його затвердіння вставляють спеціальну тефлонову або плексигласову форму, яка має прямокутні зубці – «гребінку». Спочатку «гребінку» вставляють за деяким кутом до вертикальної осі для того, щоб під її зубцями не залишалися пухирці повітря. Потім «гребінку» встановлюють строго горизонтально. Зазначену процедуру слід здійснювати швидко, до початку полімеризації поліакриламідного або застигання агарозного гелей. Якщо полімеризація почалася, положення «гребінки» ні в якому разі не можна поправляти.

Поліакриламідний гель – ПААГ. Цей гель готують з водного розчину акриламиду та *N,N'*-метилен-*bis*-акриламиду (МБА). Перша сполука слугує мономером для лінійних полімерних молекул ПАА, друга – для «зшивки» цих молекул поперековими містками. Крім зазначених компонентів необхідні ініціатор та каталізатор процесу полімеризації. У якості ініціатора використовують персульфат амонію або рибофлавін. Персульфат є нестабільним у водному розчині, тому використовують тільки свіжоприготовлений розчин. Рибофлавін слугує ініціатором тільки в разі опромінення його розчинів видимим світлом. Він дуже слабо розчинюється у воді, але добре – у слабколужних середовищах. В якості каталізатора в розчин для приготування ПАА-гелю додається звичайно ТЕМЕД. Він є ефективним у нейтральному або лужному середовищі, у кислому його треба додавати значно більше. Слід вказати, що кількість персульфату і ТЕМЕД, яка вказується у прописі, не є суворо обов'язковою. Їх точну концентрацію потрібно визначати експериментальним шляхом для кожної партії реактивів.

Кисень істотно заважає процесу полімеризації, тому вихідний розчин мономерів рекомендують піддавати деаерації, а на поверхню розчину, якій залитий у форму, рекомендують нашаровувати ізопропанол або ізобутанол. Це є необов'язковим при готуванні одношарового гелю. Найбільш якісний гель отримують, коли час полімеризації складає 30–40 хв.

У разі диск-електрофорезу потрібно готувати декілька шарів різних гелів, які послідовно розміщують один над одним. При цьому у форму спочатку заливають визначений об'єм (або до певної мітки з зовнішнього боку форми) розчину для формування робочого (поділяючого) гелю. Для того, щоб верхній край робочого гелю був ідеально рівним (без меніску), на розчин мономерів акуратно

нашаровують ізобутанол чи ізопропанол (0,5–1 мл). Справа у тому, що рівний контакт між робочим та формуючим гелем забезпечує якість розділення білкових фракцій. Після завершення полімеризації спирт зливають, його залишки збирають фільтрувальним папером. Потім у форму на робочий гель наливають розчин для формуючого (що концентрує) гелю, у який вставляють «гребінку». Достатня довжина формуючого гелю – біля 1 см. У випадку, коли досліджувана проба має значний об'єм, його довжину збільшують до 1,5 см.

Задля приготування розчинів необхідно використовувати реактиви, які призначені спеціально для електрофорезу. Необхідно пам'ятати, що акриламідні мономерні є токсичними, тому з ними потрібно працювати дуже обережно, особливо уникати потрапляння їх на шкіру і в дихальні шляхи. Вихідний розчин мономерів слід зберігати в темряві та в холодильнику (+4 °C).

Загальну концентрацію усіх мономерів, тобто відсоткове відношення маси обох мономерів до об'єму їх розчину, прийнято позначати як *T*. Символом *C* визначають відсоткове відношення маси реагенту, що зшиває (метилен-*біс*-акриламід), до загальної маси обох мономерів.

Агарозний гель. Для приготування гелю заданої концентрації агарозу розчиняють нагріванням у відповідному буфері і витримують на киплячій водяній бані (90–95 °C) біля 2 годин до формування істинного розчину. Різноманітні буфери, детергенти і інші добавки змішують з розчином агарози у гарячому стані (50-60 °C). Вони, а також кисень, не заважають процесу формування гелю.

Основна вимога до якості агарози при розділенні кислих білків – низька величина ендосмосу. Якісні препарати мають це значення не більше 0,1. Ендосмос – це додатковий електричний струм, який направлено до катоду, тобто в сторону, протилежну руху кислих білків. Внаслідок ендосмосу значно погіршується якість розподілу: зони розмиваються, можуть навіть змінювати своє положення у спектрі. Виникнення ендосмосу пов'язане з присутністю в препаратах агарози ефірів сірчаної кислоти, тому якісна агароза повинна містити не більш 0,3% сульфатів.

Гелі чистих препаратів агарози повинні бути не зовсім прозорими. Перед електрофорезом білків гель необхідно витримати не менш 12 годин, цей час потрібен для стабілізації структури гелю.

2.3. Підготовка зразків до електрофоретичного розділення

Перша умова якісного розділення – внесення в гель мінімальної кількості білка. Головне обмеження – роздільна здатність методів ідентифікації. Зниження сумарної кількості білка в зразку забезпечує краще розділення зон білків, які мають близьку електрофоретичну рухливість. Крім того, перевантаження може привести до преципітації білків через їх концентрування у момент входження в гель. Оптимальним можна вважати внесення у «кишеню» шириною 5 мм и товщиною гелю 1 мм біля 50 мкг сумарного білка. Низька сумарна кількість білка у зразку може бути недостатньою для виявлення «мінорних» фракцій, тобто тих білкових форм, вміст яких у даному препараті дуже малий. У такому випадку слід проводити аналіз одного і того ж зразку з різною кількістю загального білка. Завелика кількість білка може погіршити якість розділення деяких фракцій, але при цьому будуть помітні мінорні форми. Даний підхід рекомендують використовувати при електрофоретичному аналізі невідомих для дослідника препаратів білка. Крім того, він дозволяє оптимізувати кількість білка для конкретної електрофоретичної системи.

Бажано також, щоб внесений на гель препарат мав мінімальний об'єм: висота зразку у «кишені» повинна бути приблизно 2–3 мм. Для диск-електрофорезу ця вимога є не обов'язковою. Для розведених розчинів буває недосяжним внесення зразків у мінімальному об'ємі. Основний прийом, який дає добрий ефект – розчинення білків у розчинах, розведених у 5–10 разів порівняно з концентрацією робочого буферу гелю.

Необхідно запобігати змішуванню аналізованого матеріалу з електродним буфером, яке здійснюється внаслідок дифузії та теплової конвекції. Для цього досліджувану пробу можна полімеризувати у стартовий гель. Значно простіший інший засіб, який практично завжди використовується в останній час. У розчин з досліджуваним матеріалом вносять речовини, які підвищують його щільність. Частіше з цією метою застосовують цукрозу або гліцерин.

Однак, який би засіб чи речовина для цього не використовувались, слід враховувати, як вони вплинуть на полімеризацію гелю, стан досліджуваних білків та процес електрофоретичного розділення. Так, деякі білки можуть ушкоджуватися в ході полімеризації ПААГ, і навпаки, полімеризація

може гальмуватися у присутності білків. Сефадекс G-200 може утримувати рух білків при електрофорезі. Цукроза може взаємодіяти з ϵ -аміногрупою лізину або з боратом, який містять деякі буфери. В останньому випадку може спостерігатися так званий «ефект усіченого конусу» та бокове поширення білків у процесі електрофорезу.

Великі концентрації солі в досліджуваному препараті заважають процесу електрофорезу, тому концентрація солі у ньому не повинна перевищувати 0,05 М. Надлишок солі рекомендовано видаляти будь-яким засобом (діаліз, обробка сефадексом, гель-фільтрація та ін.). Якщо дозволяє концентрація білка у досліджуваному зразку, то його можна розбавити. У разі надлишку солі смуга препарату одразу після вступу його у гель має аномальний вигляд: розмита передня границя та чітка задня. При нормальному розділенні повинна спостерігатися протилежна картина.

Для нанесення на гель зручно використовувати білкові препарати у таких буферних розчинах, які одночасно застосовували для екстракції цих білків з досліджуваного матеріалу.

Склад деяких буферів для екстракції наведено нижче. Вибір того чи іншого буфера залежить від природи досліджуваних білків, особливостей вихідного матеріалу – джерела білків, використовуваної електрофоретичної системи, але остаточно визначається експериментатором.

Прописи деяких буферів для екстракції білків

Буферна суміш I:

Трис *HCl* – 789 мг, цукроза – 15–25 г, дитіотреїтол – 100 мг, аскорбінова кислота – 100 мг, ЕДТА-динатрієва сіль – 100 мг, *pH* 6,8. Об'єм розчину доводять до 100 мл дистильованою водою.

Буферна суміш II:

Трис основа – 1,211 г, цукроза – 15–25 г, аскорбінова кислота – 105 мг, цистеїн – 105 мг, *pH* 8,0 (доводити за допомогою 1 М *HCl*). Об'єм розчину доводять до 100 мл дистильованою водою.

Буферна суміш III:

Натрію фосфат – 50 мМ (*pH* 7,0), ЕДТА-динатрієва сіль – 0,25 мМ, аскорбінова кислота – 0,5 мМ, полівінілпіролідон – 2%, гліцерин – 20%.

Буферна суміш IV (для випадків, коли тканинний екстракт має дуже кисле значення): NaHCO_3 – 200 мг, цукроза – 20 – 25 г. Об'єм розчину доводять до 100 мл дистильованою водою.

Буферна суміш V (у разі присутності великої кількості поліфенольних сполук): Трис основа – 0,01 М, гліцин – 0,08 М, *pH* 8,3, цистеїн – 0,005 М, цукроза – 20%, іонообмінна смола Dowex 1x4 – 0,4 г на 1 г сирової тканини.

Цукрозу можна замінити гліцерином (12–15 об'ємних відсотків у розчині). В буферні суміші для екстрагування можна одразу добавляти лідируючий барвник у невеликій кількості (наприклад, бромфеноловий синій у кількості 5–10 мг на 100 мл розчину). Деякі автори рекомендують вводити у склад розчинів для екстракції додаткові речовини:

1) субстрати для відповідних ферментів (20 мг / 100 мл); можна додавати одразу декілька різних субстратів; це підвищує чіткість електрофоретичних спектрів;

2) бичачий сироватковий альбумін (40 мг / 100 мл); він зв'язує феноли та жирні кислоти, що сприяє захисту ферментів і покращенню якості електрофореграм.

Розчини повинні зберігатися у холодильнику не більш 1–2 тижнів. Вище зазначалось також, що у буфер для екстракції можна додавати детергенти з метою отримання ферментів, зв'язаних з мембранними структурами клітин.

Вже на етапі екстракції білків з тканин можна здійснювати попереднє фракціонування білків. Спочатку зразок обробляють буферною сумішшю без детергентів. Препарат центрифугують і після відбору надосадової рідини осад обробляють буфером з детергентом (наприклад, Тритоном X-100). Перша надосадова рідина містить водорозчинні білки, а екстракція тканини детергентом переведе у розчин мембранозв'язані протеїни.

2.4. Диск-електрофорез у ПААГ кислих білків

Для розділення кислих білків найбільш популярною є система Орнстейна та Девіса. Склад головних буферних розчинів даної системи наступний.

Електродний буфер: Трис – 0,005 М, гліцин – 0,038 М, рН 8,3 (доводити за допомогою HCl).

Буфер формуючого гелю – Трис – 0,0625 М, рН 6,8 (HCl).

Буфер робочого гелю – Трис – 0,38 М, рН 8,9 (HCl).

Звичайно використовують нижче наведені параметри гелю. *T* – від 3,75% до 30%. У діапазоні концентрацій гелю від 7 до 10% застосовують полімери зі значенням *C* звичайно біля 2,6%. Для розділення малих (менше 30 кД) та дуже малих (від 2 до 10 кД) молекул білків використовують дрібнопористі гелі ПАА – від 15 до 30%. У такому випадку зменшують кількість реагенту для зшивки (МБА) у два – чотири рази, тобто *C* становить 0,6–1,2% (максимально 2). За аналізу дуже великих молекул (більше 1 тис. кД) пористість гелю підвищують. При цьому загальну концентрацію гелю (*T*) знижують до 5 та менше відсотків; з метою підвищення міцності гелю збільшують значення *C* до 3–5%.

Звичайно використовують ПААГ з концентрацією 7,5%, хоча у визначених випадках можна застосувати більш або менш концентровані гелі. Кров або сироватку тварин розводять у п'ять – десять разів буфером для екстрагування та наносять на гель у кількості 2,5–5 мкл. Точні оптимальні значення добираються експериментальним шляхом. Указана кількість є достатньою щодо аналізу фракцій білка у разі фарбування кумасі. Якщо проводиться виявлення ферментної активності, то необхідно експериментально підібрати оптимальну кількість досліджуваного матеріалу.

Розчин для готування гелю ПАА (пропис див. нижче) наливають у заготовлені шаблони для вертикального або горизонтального електрофорезу. На гель наносять досліджувані проби та підключають до джерела електричного струму. Спочатку застосовують силу та напругу електричного струму, які наполовину менші основних параметрів. Такі умови підтримують до повного входження зразку у гель, після чого силу і напругу підвищують. Електрофорез ведуть, поки лідируючий барвник не досягне нижнього краю робочого гелю.

Іноді формуючий гель не використовують. Це спрощує процедуру виготовлення електрофоретичної системи. При цьому

якість розділення білків може практично не погіршуватися. Однак, це потрібно визначати експериментальним шляхом. Крім того, необхідно підтримати умови, які забезпечують концентрування досліджуваного матеріалу (розведений буфер зразка, значення його pH , яке відрізняється від pH робочого гелю; див. розділ 2.1).

Нижче наведено докладний пропис готування розчинів розглянутої системи. Таку схему можна використовувати у виготовленні будь-якої електрофоретичної системи.

Вихідні розчини та реактиви для готування гелів методом Орнстейна та Девіса

1. Концентрований розчин мономерів ПААГ:

Акриламід – 30 г, метилен-*біс*-акриламід – 0,8 г.

Розчиняють у дистильованій воді до кінцевого об'єму 100 мл.

2. Концентрований буфер для робочого гелю, (що поділяє):

1,5 М Трис-*HCl* буфер, pH 8,9.

Трис основа – 18,3 г, 1 М *HCl* – біля 24 мл.

В деяких модифікаціях у пропис буфера рекомендують додавати 0,3 г динатрієвої солі ЕДТА.

Розчиняють у дистильованій воді до кінцевого об'єму 100 мл.

3. Концентрований буфер для гелю (що концентрує):

Трис основа – 5,98 г, 1 М *HCl* – біля 48 мл, pH розчину доводять до 6,7 – 6,8.

Розчиняють у дистильованій воді до кінцевого об'єму 200 мл.

4. Концентрований електродний буфер:

Трис основа – 6,0 г, гліцин – 28,8 г, pH розчину доводять до 8,3. Розчиняють у дистильованій воді до кінцевого об'єму 1000 мл. При використанні розбавляють водою у 10 разів.

У модифікованому прописі склад концентрованого електродного буфера наступний:

Трис основа – 6,06 г, гліцин – 22,5 г, динатрієва сіль ЕДТА – 0,68 г, pH розчину доводять до 8,3.

Розчиняють у дистильованій воді до кінцевого об'єму 1000 мл.

При використанні розбавляють водою у 10 разів.

5. Амонію персульфат, сухий порошок.

6. TEMED.

7. Дистильована вода.

Пропис для готування гелів ПАА

	Номер вихідного розчину	Концентрація гелю	
		7,5%	10%
Робочий гель	1	11,25 мл	15 мл
	2	11,25 мл	11,25 мл
	5 *	10 – 20 мг	10 – 20 мг
	6 *	120 – 170 мкл	120 – 170 мкл
	7 **	22,5 мл	18,75 мл
	Формуючий гель	Номер вихідного розчину	3%
1		1,5 мл	
3		3,75 мл	
5 *		5 – 10 мг	
6 *		50 – 85 мкл	
7 **		9,75 мл	

Примітка: * – точна кількість персульфату амонію та ТЕМЕД визначається експериментально; ** – при виявленні у гелях амілазної та каталазної активності за певними методиками замість дистильованої води беруть 0,3% розчин розчинного крохмалю.

Крім системи Орнштейна та Девіса застосовується багато інших. Для кожного конкретного випадку слід звертатися до спеціальної літератури. Можна зазначити деякі системи переривчастого електрофорезу.

Деякі лужні та нейтральні буферні системи для переривчастого електрофорезу

Трис-борат-цитратна буферна система

Електродний буфер: Трис – 0,0625 М, рН 9,0 (доводити борною кислотою). *Буфер робочого гелю:* Трис – 0,19 М, рН 7,0 (доводити лимонною кислотою). ПААГ – градієнт від 4,5 до 6,8%. Дану систему використано для аналізу деяких дегідрогеназ печінки риб.

Трис-боратна буферна система

Електродний буфер: Трис – 0,005 М, борна кислота – 0,0044 М, рН 8,5 (HCl). *Буфер робочого гелю* – Трис – 0,38 М, рН 8,9 (HCl).

ПААГ – 7%. Дана система використовувалась для аналізу оксидоредуктаз еритроцитів людини.

Трис-гліцинова буферна система

Електродний буфер: Трис – 0,005 М, гліцин – 0,038 М, рН 8,1 (HCl). *Буфер робочого гелю:* Трис – 0,05 М, гліцин – 0,38 М, рН 8,1 (HCl).

Трис-веронал-фосфатна буферна система

Електродний буфер: Трис – 0,008 М, веронал – 0,030 М, рН 7,0. *Буфер робочого гелю* – Трис – 0,05 М, рН 7,5 (HCl). *Буфер формуючого гелю:* Трис – 0,0125 М, рН 5,5 (H₃PO₄). ПААГ – 7,5 – 10%. Рекомендується для розділення естераз, амінотрансфераз.

Трис-цитрат-ЕДТА буферна система

Електродний буфер: Трис – 0,22 М, лимонна кислота – 0,056 М, ЕДТА – 0,018 М, рН 7,6. *Буфер робочого гелю* – Трис – 10 мМ, лимонна кислота – 0,76 мМ, ЕДТА – 1,8 мМ, рН 8,0. Рекомендована для аналізу гемоглобінів, використовувалась також для розділення ізомерів деяких дегідрогеназ та інших ферментів.

2.5. Горизонтальний електрофорез у гелі агарози

Даний метод не має такої високої роздільної здатності, як розподіл у ПААГ. Однак, підготовка такої системи декілька простіше, вона не потребує складних приладів. Крім того, горизонтальна система дозволяє без особливих прийомів простежити білки, які мігрують також у сторону, яка протилежна основному напрямку розділення (у лужній системі – в сторону катода), тобто здійснювати двобічний електрофорез (не змішувати з двомірним електрофорезом). За таких умов «гребінку», яку використовують у якості шаблону «кишень» для зразків, можна розмістити на певній відстані від вихідного боку робочого гелю (наприклад, на одну чверть, або на одну п'яту всієї робочої довжини). Під час аналізу ферментів це може забезпечити отримання дуже цікавої додаткової інформації.

Розділення в агарозному гелі більшої кількості білкових молекул здійснюється, головним чином, лише завдяки однієї фізико-хімічної властивості: співвідношенню електричного заряду до лінійно-масових параметрів молекул.

Для розділення білків у горизонтальних гелях агарози звичайно використовують просту електрофоретичну систему. Концентрація золю агарози – 1,2-1,5% (для електрофорезу звичайно застосовується діапазон концентрацій від 0,4% до 2%). Агарозу розплавляють у буфері для електрофорезу. Кожній аналізованій зразок повинен містити близько 10 мкг білка. Оптимальний об'єм зразка в гелі товщиною 1 мм складає 3–10 мкл. Зразок крові (плазми, сироватки та ін.), що аналізуватимуть через електрофоретичний розподіл, рекомендовано розбавляти розведеним електродним буфером, щоб концентрація його була приблизно в 10 разів нижче концентрації робочого буфера.

Як вказано раніше (див. розділ 2.1.), існують оптимальні значення напруженості та сили електричного струму, яких слід дотримуватися. У певних випадках електрофорез в агарозному гелі рекомендують проводити при напруженості електричного поля не більш 5 В/см. Таким чином, при довжині гелю 15 см напруга, яка подається на електрофоретичний прилад, повинна бути 75–80 В; максимально припустима величина – 225–250 (до 300) В.

Горизонтальний електрофорез можна здійснювати і в гелях з поліакриламідом, які також забезпечують високу ефективність розподілу білкових зразків. Однак готування горизонтальних поліакриламідних гелів пов'язано з певними труднощами і потребує складних спеціальних приладів.

Деякі буферні розчини для простої (безперервної) системи електрофорезу

0,1 М Трис-гліциновий буфер, рН 8,9

Розчиняють 60,55 г Трису, 40,83 г гліцину у 700 – 800 мл дистильованої води. Доводять об'єм до 1000 мл. Перед застосуванням розбавляють у п'ять разів.

0,1 М Трис-борат-ЕДТА буфер, рН 8,9

60,5 г Трису, 6 г ЕДТА, 4,6 г борної кислоти розчиняють у 1000 мл. Перед застосуванням розбавляють у п'ять разів.

Вероналовий буфер, рН 8,6

Варіант 1. Беруть 11,3 г вероналу (діетилбарбитурової кислоти), 63,3 г вероналу натрію (мединалу), 3,09 г молочнокислого кальцію, розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм до 5000 мл.

Варіант 2. 10,32 г натрієвої солі вероналу розчиняють у 300 мл води, додають 1,84 г вероналу, перемішують та одночасно нагрівають на водяній бані до розчинення вероналу. Об'єм розчину доводять до 1000 мл.

0,089 М Трис-борат-ЕДТА буфер, рН 7,5–8,0 (ТВЕ)

Розчиняють у 700 – 800 мл дистильованої води 54 г Трису, 27,5 г борної кислоти, додають 20 мл розчину 0,5 М ЕДТА, рН 8,0. Доводять об'єм до 1000 мл. У якості робочого буфера даний розчин розводять у п'ять разів, рН такого електродного буфера складає 8,0.

Якщо при виготовленні використати незабуферений розчин ЕДТА (або додати у розчин 7,72 г сухої речовини), рН середовища буде 7,5 – 7,8.

0,08 М Трис-фосфат-ЕДТА буфер, рН 7,5–8,0 (ТРЕ)

Розчиняють у 700 – 800 мл дистильованої води 108 г Трису, 15,1 мл 85% фосфорної кислоти, додають 40 мл розчину 0,5 М ЕДТА, рН 8,0. Доводять об'єм до 1000 мл. рН такого електродного буфера складає 8,0. Перед застосуванням розбавляють у десять разів.

Якщо при виготовленні використати незабуферений розчин ЕДТА (або додати у розчин 7,44 г сухої речовини), рН середовища буде 7,5 – 7,8.

0,04 М Трис-ацетат-ЕДТА буфер, рН 7,5–8,0 (ТАЕ)

Розчиняють у 700 – 800 мл дистильованої води 242 г Трису, 57,1мл крижаної оцтової кислоти, додають 100 мл розчину 0,5 М ЕДТА, рН 8,0. Доводять об'єм до 1000 мл. У якості робочого буфера даний розчин розводять у п'ятьдесят разів, рН такого електродного буфера складає 8,0.

Якщо при виготовленні використати незабуферений розчин ЕДТА (або додати у розчин 18,61 г сухої речовини), рН середовища буде 7,5 – 7,8.

Головний недолік трис-ацетатного буфера – мала буферна ємність, тому за довготривалого електрофорезу його використання передбачає рециркуляцію розчину між катодом та анодом.

Фосфатний буфер, рН 7,7–7,8

На 1000 мл буферу беруть 0,294 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,023 М) та 3,25 г Na_2HPO_4 (0,002 М). Іонна сила розчину складає 0,12.

Трис-вероналовий буфер, рН 7,0

На 1000 мл кінцевого об'єму буферу беруть 5,53 г вероналу (діетилбарбитурової кислоти) і 1 г Трису. Дану систему рекомендують застосовувати для електрофоретичного аналізу білків, зокрема ферментів, які добре розділюються при рН 8,0, але є нестійкими при рН вище 8,0.

Деякі буферні системи, які мають значення рН біля 7,0

1. *Електродний буфер*: лимонна кислота – 0,41 М, рН 7,0 (NaOH). *Буфер робочого гелю*: гістидин \times HCl – 0,005 М, рН 7,0 (NaOH).

2. *Електродний буфер*: Трис – 0,135 М, лимонна кислота – 0,043 М, рН 7,0. *Буфер робочого гелю*: гістидин \times HCl – 0,005 М, рН 7,0 (NaOH).

3. *Електродний буфер*: Трис – 0,135 М, лимонна кислота – 0,043 М, рН 7,0. *Буфер робочого гелю*: електродний буфер розводиться у 15 разів.

Готування розчину 0,5 М ЕДТА, рН 8,0

Змішують 186,1 г динатрієвої соли ЕДТА \times 2 H_2O з 800 мл дистильованої води, додають NaOH (приблизно 20 г), поки рН розчину не досягне значення 8,0. Доводять об'єм до 1000 мл.

Коли з'являється ризик агрегації білків, у буфер робочого гелю та зразок вводять сечовину. Так, при аналізі трипсиногену і хімотрипсиногену використовували наступну систему. *Електродний буфер*: Трис – 0,025 М, гліцин – 0,019 М, рН 8,5. *Буфер робочого гелю*: електродний буфер + сечовина 1,6 М.

Усі вищезазначені буферні системи можна використовувати й для вертикального електрофорезу з будь-якими гелями.

2.6. Електрофорез лужних білків

Електрофоретичне фракціонування лужних білків здійснюють за тими ж принципами, що й електрофорез кислих білків. Можна

використати будь-які системи розділення, застосувати вертикальні або горизонтальні гелі. Основна відмінність полягає у величині pH буферів, що використовують: середовище повинно бути кислим. Відповідно, слід пам'ятати про основний напрямок руху білків: до негативно зарядженого електрода, тобто до катода.

Ще одна проблема, з якою можна зіштовхнутися при розподілі лужних білків: деякі з них погано розчинюються та легко агрегують. Для вирішення зазначеної проблеми застосовують реагенти, які сприяють розчиненню та дезагрегації молекул досліджуваних білків: сечовину (у концентрації від 2 до 8 М), тритон X-100 (до 1%), інші речовини та їх композиції. Оптимальне співвідношення детергенту і сечовини добирають експериментальним шляхом для конкретного типу білків.

Так, аналіз мембранних білків бактерій провадили після їх екстракції у 5% оцтовій кислоті з доданням 4 М сечовини, 5% β -меркаптоетанолу та 2% Тритону X-100. Електрофоретичне розділення отриманих білків здійснювали у 12% ПААГ ($C = 0,8\%$), якій був полімеризований у 5% розчині оцтової кислоти з 8 М сечовиною і 0,012 М (0,75%) Тритоном X-100.

Задовільне розділення α - та β -ланцюгів глобіну одержано в аналогічній системі: 12,5% ПААГ, виготовлений у 5% оцтовій кислоті з 6 М сечовиною і 0,5% Тритоном X-100 (попередню денатурацію білків проводили у присутності 5% меркаптоетанолу).

Дуже широко використовується кисла сечовина, а також її композиція з Тритоном X-100, для аналізу гістонів та рибосомних білків. Цікаво те, що рибосомні білки погано зв'язуються з зазначеним неіонним детергентом. Дана особливість була використана для відокремлювання гістонів від рибосомних білків з близькими молекулярними масами.

Деякі кислі буферні системи для простого та переривчастого електрофорезу

Трис-цитратна буферна система, pH 6,2

Електродний буфер: 13,55 г Трису (0,112 М), 9,87 г моногідрату лимонної кислоти (0,047 М) розчинюють у 1000 мл води, pH 6,2 (доводити за допомогою $NaOH$).

Буфер робочого гелю: електродний буфер розбавляють у 11 разів, pH 6,2.

0,05 М цитратний буфер, рН 6,0 (до 6,5)

I варіант. 10,504 г лимонної кислоти (моногідрату) на 1000 мл дистильованої води. Необхідне значення рН доводять за допомогою N-(3-амінопропіл)-морфоліну. Для виготовлення буфера робочого гелю даний розчин розбавляють у 20 разів.

II варіант. Готують розчини лимонної кислоти (10,504 г моногідрату лимонної кислоти у 1000 мл води) та цитрату натрію (до 10,504 г моногідрату лимонної кислоти додають 100 мл 1 М NaOH і доводять об'єм до 1000 мл). Для отримання середовища з рН 6,0 беруть 190 мл розчину лимонної кислоти і 810 мл розчину цитрату натрію; для одержання значення рН 6,5 – 85 мл та 915 мл відповідно.

Гістидин-цитратна буферна система, рН 5,7

Електродний буфер: 10,09 г гістидину (0,065 М), 4,20 г моногідрату лимонної кислоти (0,02 М) розчиняють у 1000 мл води, рН 5,7.

Буфер робочого гелю: електродний буфер розбавляють у 7 разів. рН 5,7.

Трис-цитратна буферна система, рН 5,5

Електродний буфер: 26,98 г Трису (0,223 М), 18,07 г моногідрату лимонної кислоти (0,086 М) розчиняють у 1000 мл води, рН 5,5.

Буфер робочого гелю: 35 мл електродного буферу розводять до 1 літра, рН 5,5.

Гістидин-цитратна буферна система, рН 5,0

Електродний буфер: 7,76 г гістидину (0,05 М), 5,04 г моногідрату лимонної кислоти (0,024 М) розчиняють у 1000 мл води, рН 5,0.

Буфер робочого гелю: електродний буфер розбавляють у 13 разів, рН 5,0.

Аланін-ацетатна буферна система, рН 4,5

Електродний буфер: 32,1 г β-аланіну, 8,01 мл крижаної оцтової кислоти розчиняють до кінцевого об'єму 1000 мл. За допомогою крижаної оцтової кислоти доводять рН до необхідного значення. Концентрація аланіну у буфері – 0,36 М. Такий розчин застосовують у якості електродного буфера.

Буфер робочого гелю: електродний буфер розбавляють у 5 разів, *pH* 4,5.

Аланін-ацетатна буферна система, *pH* 4,5–4,3

Електродний буфер: 32,1 г β -аланіну, 8,01 мл крижаної оцтової кислоти розчиняють до кінцевого об'єму 1000 мл. За допомогою крижаної оцтової кислоти доводять *pH* до необхідного значення. Для виготовлення електродного буфера розчин розбавляють у 10 разів. Кінцева концентрація аланіну у буфері – 0,036 М.

Буфер робочого гелю: 3,36 г КОН (0,06 М) розчиняють у 700 – 800 мл води, за допомогою крижаної оцтової кислоти доводять *pH* до 4,3 та доливають води до 1000 мл.

Гліцин-ацетатна буферна система, *pH* 4,0

Беруть 28,1 г гліцину, 3,06 мл крижаної оцтової кислоти та розчиняють у кінцевому об'ємі 1000 мл. *pH* розчину доводять за допомогою крижаної оцтової кислоти. Перед використанням отриманий розчин розбавляють водою у десять разів. Кінцева концентрація гліцину у буфері – 0,037 М.

Дана система застосовується для безперервного (простого) електрофорезу, тобто даний буфер використовують у якості електродного та робочого буферів.

Гліцин-ацетатна буферна система, *pH* 4,0–2,9

Електродний буфер: готують розчин, як у попередній буферній системі.

Буфер робочого гелю: 3,36 г КОН (0,06 М) розчиняють у 400 – 500 мл води, за допомогою крижаної оцтової кислоти доводять *pH* до 2,9 та доливають води до 1000 мл.

2.7. Визначення молекулярної маси білків за допомогою електрофорезу

Існує багато способів визначення молекулярної маси білків за допомогою електрофорезу. Найбільш придатним для цього є електрофорез у ПААГ з ДДС-*Na* (*SDS*). Електрофорез можна провадити як у простій (безперервній) системі, так і в переривчастій (диск-електрофорез). З різних варіантів *SDS*-електрофорезу найбільш

розповсюджені два: метод Вебера і Осборн та метод Леммлі. Друга система отримала у останній час дуже велику популярність.

Електрофорез за Вебером та Осборн

У даному методі застосовується безперервна система електрофорезу, тобто у якості буфера робочого гелю та електродного буфера використовується один і той же розчин, а саме – 0,1 М натрій-фосфатний буфер, pH 7,0–7,1 з доданням ДДС-*Na* до 0,1%. В зв'язку з тим, що даний буфер має велику електропровідність, напруженість електричного поля при електрофорезі підтримують не більш ніж 5 В/см, що обумовлює тривале розділення. Л. А. Остерман рекомендує застосовувати інший буфер з меншою електропровідністю, наприклад, 0,05 М імідазол-фосфатний буфер, pH 7.

Зразки білка розчинюють у 0,01 М натрій-фосфатному буфері, pH 7,0–7,1, який містить 1% ДДС-*Na* та 1% β -меркаптоетанолу. Препарати інкубують 2 години за 37°C. Перед внесенням препарату в гель концентрацію меркаптоетанолу підвищують до 4–5%. Застосовують також більш жорстку термічну обробку препаратів: 100 С, 2 хвилини; за наявності у препараті протеаз тривалість обробки збільшують до 5 хвилин. Концентрація білка у препараті повинна бути приблизно 1 мг/мл. При жорстких умовах обробки ліпопротеїни можуть випадати у осад. У таких випадках слід знижувати кількість β -меркаптоетанолу або зовсім його виключити. Якщо у вихідному препараті білка є багато солі, його потрібно до обробки діалізувати проти 0,01 М натрій-фосфатного буфера з 0,1% ДДС-*Na* та 0,1% β -меркаптоетанолу. Коли вихідний білковий препарат знаходиться в осаді, його необхідно попередньо розчинити у буфері і тільки потім добавляти детергент із концентрованого розчину. У протилежному випадку на поверхні осаду може утворитись кірка, яка буде заважати повному розчиненню білка.

Параметри гелю: T – 10%, C – 2,6–2,7% (тобто можна використовувати вихідний розчин мономерів, який наведено у розділі 2.4). На 100 мл розчину гелю додається 92 мг персульфату амонію та 150 мкл ТЕМЕД. Можливі варіанти концентрації гелю і ступеня його зшивки.

Якщо є загроза агрегації білків, у розчин препаратів та буфер гелю додають сечовину у концентрації до 8 М.

0,1 М натрій-фосфатний буфер, рН 7

Вихідні розчини: 1) 0,2 М $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ (71,7 г/л);
2) 0,2 М $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (27,58 г/л).

Для приготування робочого буфера 610 мл розчину 1) змішують з 390 мл розчину 2) та доводять об'єм до 2 літрів.

0,05 М імідазол-фосфатний буфер, рН 7

Вихідні розчини: 1) 0,2 М імідазол (13,62 г/л);
2) 0,1 N H_3PO_4 .

Для приготування робочого буфера 250 мл розчину 1 титрують за допомогою розчину 2 до необхідного значення рН та доводять об'єм до 1 л.

0,05 М Трис-малеатний буфер, рН 7

Вихідні розчини: 1) 24,2 г Трис основи, 23,2 г малеїнової кислоти (або 19,6 г малеїнового ангідриду) розчинюють у дистильованій воді до кінцевого об'єму 1000 мл; 2) 0,2 М $NaOH$.

Для приготування робочого буфера 500 мл розчину 1) змішують з 480 мл розчину 2) та доводять об'єм до 2 літрів.

Пропис інших буферних систем з рН 7 наведено також у розділі 2.5.

Електрофорез за Леммлі

У даному методі використовують ступінчастий електрофорез. У даній системі застосовуються ті ж вихідні розчини, що у системі Орнстейна та Девіса, однак у інших пропорціях.

Білкові зразки можна розчинювати в універсальному буферному розчині I (див. розділ 2.3), до якого додають ДДС-*Na* до 2% та β-меркаптоетанол до 5%. Термічну обробку провадять, як зазначено вище.

Електродний буфер за Леммлі у 5 разів більш концентрований, ніж за системою Орнстейна і Девіса, тобто Трис – 0,025 М, гліцин – 0,192 М, рН 8,3. Крім того до нього додається ДДС-*Na* до 0,1%.

Буфер формуючого гелю (що концентрує) за Леммлі удвічі більш концентрований, ніж за Орнстейном і Девісом (0,125 М Трис-*HCl*, рН 6,8, з доданням 0,1% ДДС-*Na*). Концентрація ПАА у ньому – 3%.

Буфер робочого (що поділяє) гелю такий самий, як у Орнстейна і Девіса (0,375 М Трис-*HCl*, рН 8,8–8,9, з доданням 0,1% ДДС-*Na*).

Концентрація робочого гелю 10% (або інша). Для обох гелів значення C звичайно складає 2,6–2,7%. Для полімеризації у кожний гель вносять 25 мг персульфату амонію та 25 мкл ТЕМЕД на 100 мл розчину. Зручніше електрофорез проводити протягом ночі з мінімальною силою та напруженістю електричного поля (оптимальні значення добирають експериментально для конкретних умов).

Фіксацію та фарбування звичайно здійснюють розчинами 50% ТХО або ТХО з ізопропанолом.

Електрофорез за Леммлі використовують також у сполученні з градієнтом пористості гелю. Така комбінація значно підвищує роздільну здатність методу.

Основні умови щодо розрахунку молекулярних мас білків

Для розрахунку молекулярних мас досліджуваних білків необхідно мати калібрувальну криву. Для її одержання проводять електрофорез декількох очищених білків з відомою молекулярною масою за тих же умов, що і досліджувані білки. З цією метою готують суміш визначених білків із розрахунку по 1 мкг кожного у зразку, який наносять в одну кишеню. Після цього будують графік залежності відносної електрофоретичної рухливості (див. розд. 2.9.1) від логарифму молекулярної маси, з якого знаходять шукану масу досліджуваного білка. У таблиці 3 представлені білки з відомими характеристиками. Слід підкреслити, що добір маркерних білків повинен ураховувати не тільки розміри молекул, а також інші властивості (конформацію, хімічний склад та інше). Так, при аналізі фібрилярних білків непридатні глобулярні маркерні і навпаки. Цю проблему можна обійти, якщо будувати графік залежності відносної електрофоретичної рухливості від довжини поліпептидного ланцюга, тобто від логарифму кількості амінокислотних залишків.

Визначення маси досліджуваних білків буде надійним у випадку лінійності такої залежності. Однією з умов є правильний підбір пористості (тобто концентрації гелю). Для певних діапазонів молекулярних мас білків рекомендовані наступні концентрації ПААГ (при C біля 3%): для молекул з масою від 18–20 до 330–350 кД – 5% гелі; для білків від 10 до 100 кД – 10% гелі; для білкових молекул розміром від 10 до 60 кД – 15% гелі. Для визначення молекулярної маси зовсім невідомого білка рекомендують починати використовувати гель з концентрацією 7,5% та відповідні маркери. Далі на основі отриманих результатів продовжувати добір оптимальних умов електрофоретичного розділення.

Деякі маркерні білки

Білок	Молекулярна маса, кД	$\lg M$
Цитохром <i>c</i>	11, 700	4,068
Лізоцим яєчного білка	14, 300	4,155
Міоглобін	17, 200	4,236
Інгібітор трипсину із сої	20, 100	4,303
γ -Глобулін (L-ланцюг)	23, 500	4,371
Хімотрипсиноген А	25, 700	4,410
Карбоангідраза	29, 000	4,462
Лактатдегідрогеназа з серця свині	36, 000	4,556
Альдолаза з м'язів кроля	40, 000	4,602
Овальбумін	43, 000	4,633
γ -Глобулін (H-ланцюг)	50, 000	4,699
Глутаматдегідрогеназа з печінки бика	53, 000	4,724
Каталаза з печінки бика	57, 500	4,760
Альбумін людини	68, 000	4,832
Трансферин	77, 000	4,886
β -Галактозидаза <i>E. coli</i>	130, 000	5,114
Важкий ланцюг міозину з м'язів кроля	212, 000	5,326

Визначення молекулярної маси білків меншої 12 кД стає ненадійним навіть в умовах високої концентрації гелю. Для підвищення надійності розрахунків мас невеликих молекул у буфер робочого гелю вводять сечовину до 8 М, а також збільшують ступінь його зшивки (значення C доводять до 9% при $T = 12,5\%$). За таких умов спостерігали лінійну залежність у діапазоні мас від 1 до 12 кД. Однак, точки для інсуліну (5,782 кД) та глюкагону (3,483 кД) завжди випадали з таких прямих.

Якість розділення та надійність визначення мас поліпшується, якщо використовувати невелику вихідну кількість досліджуваного білка (1–5 мкг). Для цього також буде корисним подовження робочого гелю до 15 см.

2.8. Візуалізація білкових фракцій на електрофореграмах

2.8.1. Візуалізація загальної картини розташування в гелях білків після електрофоретичного розділення

Виявлення білкових компонентів у гелях здійснюють за допомогою різних способів. Найбільш розповсюдженими є методи, засновані на використанні спеціальних барвників, що зафарблюють білки. Надійна фіксація білків – обов'язкова умова їх якісного фарбування. Зрозуміло, що задля прояву ферментної активності дану процедуру не здійснюють, оскільки вона, за деякими винятками, призводить до повної інактивації ферментів. Звичайно процедуру фіксації білків виконують одночасно з їх фарбуванням.

Гелі можна фарбувати розчинами барвника „амідо-шварц” (амідо-чорний, «*Amido Black 10B*», «*Naphthalene Black 12B*»). Застосовують 0,1–1% розчин барвника у 7–10% оцтовій кислоті. Фарбування здійснюють протягом від 10–15 хвилин до декількох годин або ночі (тривалість залежить від кількості білка). Фон знебарвлюють відмиванням гелю у 7% оцтовій кислоті. Амідо-чорний має ряд недоліків, а саме: недостатньо високу чутливість, неоднакову кількість зв'язування з різними білками, дуже обмежений діапазон лінійної залежності інтенсивності забарвлення від кількості білка.

У нинішній час головним чином використовують інший барвник – кумасі яскраво-блакитний («*Coomassie brilliant blue*») у двох модифікаціях *R-250* та *G-250*. Даний барвник має значно більшу чутливість, ніж амідо-чорний.

Існують багато прописів готування цього барвника, які розрізняються концентрацією забарвлюючого реагенту та підбором розчинників. Фарбування гелів проводять протягом декілька годин. Як правило, буває достатньо 1–3 год. Якщо гель має велику товщину або мало білків, тривалість можна збільшити до 12 годин, але цього слід уникати. Для прискорення процесу фарбування можна його проводити при +37 °C і навіть при більш високій температурі, періодично хитаючи гель у розчині. Відношення об'єму забарвлюючого розчину до об'єму гелю приблизно складає 3 : 1.

Більш тривала процедура – вимивання від залишків барвника. Для цього застосовують 7–9% оцтову кислоту або її суміш з 5–20% спиртом. Відношення об'єму миючого розчину до об'єму гелю

повинно бути не менш 5 : 1, краще 10 : 1. При цьому необхідно здійснювати декілька змін миючого розчину. Можливе також відмивання гелю водою. Однак у такому випадку процедура буде значно тривалішою.

Нижче наведено декілька варіантів готування розчину барвника.

I варіант. Готують 0,5% розчин кумасі яскраво-блакитного R-250 у суміші метанол – оцтова кислота – дистильована вода (9 : 2 : 9), нагрівають до +60 °С, залишають для охолодження та фільтрують при кімнатній температурі.

Часто використовують більш низькі концентрації барвника: 0,05–0,25%. Як розчинник можна застосувати іншу суміш: 9–10% оцтова кислота з 40–45% етанолом. Склад розчинника не має принципового значення. Головне, щоб білки у ньому висаджувалися та барвник добре розчинювався.

II варіант. Після електрофорезу у присутності ДДС натрію виникає необхідність попередньо видалити детергент із гелю, оскільки він запобігає повному висаджуванню білків. Для цього застосовують обробку гелю у 10% (концентрацію кислоти можна підвищити до 20–50%) розчині ТХО протягом ночі. При цьому у фіксуючий розчин добре додавати ізопропанол до 25%. Після фіксації гель фарбують будь-яким розчином.

Можна також фарбувати білки одночасно з фіксацією 0,02–0,05% розчином кумасі R-250 у 10–12,5% ТХО. Тривалість обробки 30–60 хвилин. Барвник погано розчинюється у ТХО, тому гель обробляють суспензією барвника, і його практично не потрібно вимивати з гелю. Однак, чутливість даного засобу декілька нижча.

Для фіксації білків після електрофорезу у присутності сечовини можна використати розчин, якій містить 5% ТХО та 5% сульфосаліцилової кислоти.

III варіант. Готують 0,04% колоїдний розчин кумасі G-250 у 3,5% водному розчині хлорної кислоти, фільтрують від нерозчинених часток і отримують коричневий колоїдний розчин. Гель обробляють 1,5 години при кімнатній температурі, після чого переносять у 5% розчин оцтової кислоти. При такому способі фарбування фон гелю практично можна не відмивати.

IV варіант. Деякі лужні білки (наприклад, рибонуклеази, протаміни та інші), навпаки, розчиняються у кислотах та спиртах і вимиваються з гелів стандартними методами фіксації. У даних випадках використовують розчин: 0,11% кумасі R-250 у 5%

формальдегіду та 25% етанолі. Дану суміш можна застосовувати для фарбування гелів після електрофорезу з ДДС натрію.

Лінійність залежності «інтенсивність забарвлення : кількість білка» за фарбування розчинами кумасі зберігається все ж у незначному діапазоні – до 3 мг білка / см² (за іншими даними до 10).

Для фарбування білків застосовують багато інших барвників. Наприклад, швидкий зелений *FCF* (харчовий зелений 3, *C.I.* 42053). За чутливістю метод з використанням цього барвника практично не поступається іншим, хоча застосування кумасі забезпечує виявлення більш низьких концентрацій білка. Головна привабливість цього барвника: збереження у значно більшому діапазоні концентрацій білка (приблизно на порядок) лінійної залежності між кількістю білка у смузі та інтенсивністю її забарвлення. Гель утримують 2 години у 1% (маса / об'єм) розчині швидкого зеленого у 7% оцтовій кислоті. Знебарвлення фону гелю здійснюють розчином 7% кислоти.

Для виявлення дуже незначної кількості білка вищезазначені способи можуть бути непридатними, однак розроблені методи, які здатні виявити білок у концентрації 10⁻⁴ мкг / мм². Принцип цих способів засновано на фарбуванні білків іонами срібла. Досконалий аналіз даних методів і літературні посилання на авторів наведено у монографії Л. А. Остермана.

Один з варіантів полягає у наступному. Гелеві пластини фіксують у розчині 12% оцтової кислоти і 50% метанолу (10 хв), потім два рази по 5 хв у 5% оцтовій кислоті з 10% етанолом. Далі гель вимочують 5 хв у 5% розчині заліzosиньородистого калію (червона кров'яна сіль). Три рази прополіскують у воді. Потім гель заливають розчином складу: 0,2% нітрат срібла, 0,2% нітрат амонію, 5 мл 37% формальдегіду, 0,00006% бензтриазолу. Гель у цьому розчині освітлюють протягом 20 хвилин потужною лампою накаливання (1,5 кВт). Потім розчин зливають і гель без обполіскування заливають 3% розчином Na_2CO_3 , який містить 0,1 мл формальдегіду та 0,12 мг бензтриазолу на 200 мл розчину. Розчин карбонату натрію змінюють 2–3 рази. При цьому освітлення не переривають, поки не буде досягнута бажана інтенсивність забарвлення білків. Фарбування зупиняють, занурюючи гель на 5 хвилин у 1% розчин оцтової кислоти, потім промивають водою. Для отримання рівномірного забарвлення гелю всі етапи процесу здійснюють за обережним погойдуванням кювети з розчином та гелем.

2.8.2. Диференціальне фарбування складних протеїнів

Є багато складних білків, які крім амінокислотного ланцюга містять також речовини небілкової природи (простетичні групи): ліпопротеїни, фосфопротеїни, глікопротеїни, нуклеопротеїни та хромопротеїни. Можливе забарвлення окремих форм зазначених складних білків.

Різні біополімери можна одночасно фарбувати за допомогою барвника «*Stains-all*». При цьому різні хімічні сполуки зафарблюються у різноманітні кольори: глікопротеїни, фосфопротеїни – у синій, прості білки – у червоний, ліпіди – у жовто-помаранчевий, ДНК – у синій, РНК – блакитнувато-пурпурний. Однак, чутливістю «*Stains-all*» помітно поступається спеціалізованим барвникам.

Готують 0,1% вихідний розчин «*Stains-all*» у 100% формаміді, якій можна зберігати місяць у холодильнику. Робочий його розчин: 0,0012% «*Stains-all*» у 0,01 М Трис-*HCl* буфері, *pH* 8,5, з 5% формаміду та 25% ізопропанолу. Гелі обробляють робочим розчином у темряві протягом ночі. Відмивають у воді, однак, це не є обов'язковим, оскільки вільний барвник (без зв'язку з білком) легко вицвітає на світлі, і фон гелю через опромінення швидко стає безкольоровим.

ДДС натрію заважає фарбуванню, тому його слід видаляти. Для цього гель обробляють 15 хвилин при +50 °С у розчині 25% ізопропанолу.

Фарбування ліпопротеїнів

Встановлено, що спиртові та спиртово-оцтові розчини не є повністю надійними для фіксації ліпопротеїнів: частина білків може вимиватися з гелів. Більш стабільні результати отримують при використанні 2,5–5% водного розчину формальдегіду, а також суміші насиченого водного розчину пікринової кислоти з 20% оцтовою кислотою. Дуже добрий ефект дає 1% водний розчин уранілацетату: він не тільки надійно фіксує, але й збільшує здібність ліпопротеїнів до зв'язування барвника.

І засіб. Найбільш розповсюджений засіб – застосування специфічного забарвлення ліпідного компонента.

1 варіант готування барвника. 100 мг судану чорного розчиняють нагріванням у водяній бані (до кипіння) у 100 мл 60% етанолу, два рази фільтрують через щільний фільтрувальний папір.

2 варіант готування барвника. 400 мг судану чорного суспендують у 120 мл 96% етанолу, змішують з розчином 4 мг ацетату цинку у 80 мл дистильованої води. Суміш нагрівають до кипіння. Після охолодження фільтрують при кімнатній температурі і зберігають у темному посуді. Розчин, якщо він стає бурим, не придатний до використання.

3 варіант готування барвника. 120 мг судану чорного суспендують у суміші 98 мл 60% етанолу з 2 мл 1 М розчину *NaOH*. Суміш нагрівають до кипіння, потім охолоджують.

Для підтримування барвника у розчинному стані до суміші додають декілька крапель детергенту «твин 20». З метою запобігання появи фальшивих смуг хіломікронів етанол замінюють на етиленгліколь.

Фарбування електрофореграм виконують згідно з наступною процедурою. Гель обробляють 20 хв у 5% ТХО або в інших фіксуєчих сумішах, придатних до фіксації ліпопротеїнів. Потім поміщують в один з вищезазначених забарвлюєчих розчинів на 2–3 години. Гель відмивають декілька хвилин у розбавленому етанолі (96% етанол : дистильована вода у відношенні 1 : 1). Ліпопротеїни забарвлюються у темно-синій колір.

II засіб. Можливо одночасне контрастне фарбування на одному гелі ліпопротеїнів та інших білків. Для цього використовують суміші різних барвників.

1 суміш. 50 мг амідочорного 10В розчиняють у 2 мл крижаної оцтової кислоти і змішують з 98 мл 60% етанолу, насиченого барвником «жировим червоним».

2 суміш. 50 мг азокарміну В розчиняють у 2 мл крижаної оцтової кислоти і змішують з 98 мл 60% етанолу, насиченого барвником «суданом чорним В».

Фон гелів знебарвлюють у розчині 1% оцтової кислоти з 50% етанолом.

III засіб. Замість специфічного забарвлення для прояву ліпопротеїнів застосовують також їх осаджування поліаніонами. Одразу після електрофорезу агарозні гелі поміщають на 1 годину у 0,6% розчин натрієвої солі декстрансульфату 2000 з 0,2 М хлористим кальцієм. Біля 95% всіх ліпопротеїнів за такою методикою осаджуються та проявляються у вигляді білих тьмавих смуг на прозорому фоні. Деякі форми ліпопротеїнів осаджуються гепарином.

Для цього гелі витримують не менш 30 хв у 0,25% розчині гепарину в 0,9 М $NaCl$ з доданням 0,1 М хлористого магнію.

Фарбування глікопротеїнів

I засіб. Гель фіксують 45 хвилин у 10% розчині солянокислого гідроксиламіну, виготовленому на 0,2 М ацетатному буфері pH 4,7. Буфер готують з рівних об'ємів 0,4 М ацетату натрію та 0,4 М оцтової кислоти. Далі гель промивають 15 хвилин у проточній водопровідній воді.

Гель витримують 10 хвилин в 1% розчині йодної кислоти з 0,2 М ацетатом натрію і знову промивають 10 хвилин проточною водою.

Потім гель поміщають на 5–10 хвилин у забарвлюючу суміш. Її готують безпосередньо перед фарбуванням шляхом змішування рівних об'ємів розчинів 0,01 М α -нафтолу (144 мг на 100 мл) та 0,01 М *n*-фенілендіаміну (216 мг на 100 мл) у 0,1 мМ нейтралізованому ЕДТА. Крім зазначених розчинів у суміш додають також розчин 3% H_2O_2 у кількості 1/5 від кінцевого об'єму суміші. α -Нафтол розчинний тільки при підвищеній температурі, його можна попередньо розчинити у невеликій кількості (0,5–1 мл) етанолу. Після фарбування гель промивають 5–10 хвилин у проточній воді. Глікопротеїни мають синьо-фіолетовий колір.

II засіб. Гель фіксують 30 хвилин у розчині 12,5% ТХО, обполіскують дистильованою водою та занурюють на 50 хвилин у 1% розчин йодної кислоти з 5% оцтовою кислотою. Для видалення надлишку періодату гель декілька разів промивають дистильованою водою. Потім гель поміщають на 30 хв у 0,5% розчин метабисульфїту натрію, промивають дистильованою водою і занурюють у розчин, що містить 0,5% алціанового синього та 3% оцтової кислоти. Процес забарвлення триває біля 4 годин. Фон знебарвлюють розчином 7% оцтової кислоти.

III засіб. Спочатку дана методика була запропонована для паперових електрофореграм, але з певними модифікаціями її можна використати для гелів, зокрема, поліакриламідних.

Гелі промивають два рази дистильованою водою. Фіксують протягом ночі розчином 40% етанолу у 5% оцтовій кислоті, потім поміщають на 2–3 години у 1% розчин йодної кислоти.

Електрофореграми обробляють 30 хв у першій порції розчину, що відновлює, після чого переносять на 1,5–2,5 години у свіжу

порцію розчину, що відновлює (R). Гелі промивають дистильованою водою.

Електрофореграми поміщують на 12–18 годин у реактив Шиффа.

Далі гелі обробляють 1–2 години у розчині A_1 для промивки гелів, потім до 6–8 годин у розчині B_2 для промивки гелів (при цьому повинно бути декілька змін розчину).

Деякі автори вважають, що при гістохімічному виявленні вуглеводів промивання після обробки реактивом Шиффа розчином сульфїту (як агента, що відновлює) не є необхідним. Дану процедуру можна замінити промиванням у проточній воді не менш 10 хвилин.

Готування 1% розчину йодної кислоти

Шість грамів KJO_4 розчиняють у 500 мл метанолу та додають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Суміш енергійно перемішують протягом 8 годин. Отриманий розчин йодної кислоти зливають з осаду, доводять метанолом до об'єму 500 мл. Розчин зберігають у холодильнику не більш тижня та використовують для окиснення 3–4 рази.

Метанол можна замінити етанолом, до якого додається оцтова кислота до концентрації 5%.

Готування розчину, що відновлює (R)

Розчин А: 50 г KJ та 50 г $Na_2S_2O_3 \cdot H_2O$ розчиняють у 1000 мл води.

Розчин В: 35 мл 1 N розчину HCl доводять водою до 1000 мл.

Перед використанням змішують 2 об'єми розчину А і 1 об'єм розчину В.

Соляну кислоту можна замінити на оцтову кислоту з кінцевою концентрацією 5%.

Реактив Шиффа

4 г фуксину основного розчиняють у 1000 мл води, нагрітої до 90–95 °С. Розчин ретельно перемішують, поки його температура не досягне 40°С. Після цього до розчину фуксину додають 8 г $K_2S_2O_3$ та 10 мл концентрованої соляної кислоти. Розчин залишають у міцно зачиненій склянці на 16–18 годин. Потім додають 2 г активованого вугілля (обробленого соляною кислотою), ретельно перемішують та фільтрують через скляну вату. Слід уникати контакту з фільтрувальним папером. Розчин повинен бути прозорим і безколірним. Зберігати можна у холодильнику протягом місяця. Поява рожевого забарвлення свідчить про непридатність реактиву.

Розчин для промивки гелів

16 г $K_2S_2O_3$ розчиняють у 2 л води (основний розчин).

Розчин А₁: до 500 мл основного розчину додають 10 мл концентрованої соляної кислоти.

Розчин В₂: до 1,5 л основного розчину додають 15 мл концентрованої соляної кислоти.

Основний розчин готують безпосередньо перед застосуванням.

Соляну кислоту можна змінити на оцтову, концентрацію якої доводять до 5%. У такому разі використовується один варіант розчину для промивки.

IV засіб. Гелі фіксують 30 хвилин у 12,5% ТХО, промивають дистильованою водою. Потім поміщають у 1% розчин йодної кислоти з 5% оцтовою кислотою на 50–60 хвилин. Далі гелі промивають декілька разів дистильованою водою, а потім обробляють 30 хвилин 0,5% розчином метабісульфіту натрію. Знову промивають дистильованою водою. Після чого гелі поміщають на 4 години у 0,5% розчин алціанового синього у 3% оцтовій кислоті. Фон гелю знебарвлюють 7% оцтовою кислотою.

Фарбування фосфопротеїнів

I засіб. Після електрофорезу гель кладуть у забарвлюючий розчин наступного складу: кумасі R-250 – 0,05%, нітрат алюмінію $Al(NO_3)_3$ – 0,1 М, оцтова кислота – 10%, ізопропанол – 25%, Тритон X-100 – 1%. Гель відмивають у розчині 7% оцтової кислоти.

II засіб. Гель після електрофорезу фіксують у 10% розчині сульфосаліцилової кислоти. Декілька разів промивають цим же розчином для того, щоб віддалити з гелю низькомолекулярні сполуки, що містять фосфор. Потім гель обробляють розчином 0,5 М $CaCl_2$ не менш години. Після цього гель швидко промивають дистильованою водою та витримують 30 хв при температурі 60°C у розчині 0,5 М $NaOH$. Далі гель багаторазово промивають розчином 1% молібдату амонію. Потім гель замочують 30 хвилин у 0,5% розчині метилового зеленого з 7% оцтовою кислотою. Залишок барвника вимивають з гелю розчином 10% сульфосаліцилової кислоти.

Цей метод є дуже чутливим і дозволяє виявити 1 нмоль зв'язаного з білком фосфору.

Фарбування нуклеопротеїдів

Прояв нуклеопротеїнів і нуклеїнових кислот здійснюють звичайно за допомогою барвника «піронину Y».

Готують вихідний 2% розчин піронину, якій очищують шляхом багаторазового екстрагування хлороформом, та зберігають у посуді з темного скла.

Перед використанням вихідний розчин барвника розбавляють у 10 разів 0,1 М ацетатним буфером, рН 4,7 (готування аналогічного буфера див. у підрозділі «Фарбування глікопротеїнів»). Тривалість фарбування – від 30 до 60 хвилин; фон знебарвлюють промиванням у проточній воді. Нуклеопротеїни забарвлюються у червоний колір.

Прояв білків, що містять залізо

I засіб. Для встановлення присутності білків, що містять залізо, застосовують їх здатність здійснювати пероксидазну активність (див. розділ 2.8.3.).

II засіб. Для виявлення білків, що містять залізо, можна використати сполуки, специфічні до іонів цього металу.

1 варіант. Високочутливим до заліза реагентом є 4,7-дифеніл-1,10-фенантролін (батофенантролін). Гель утримують 1–2 години у 0,01% розчині цього реагенту з 0,02 М ацетатом натрію. Розчин батофенантроліну готують безпосередньо перед використанням. Потім до розчину реагенту на залізо, у якому знаходиться гель, додають тіогліколеву кислоту (0,5 мл на 100 мл) та витримують декілька хвилин. Далі гель багаторазово промивають 2% оцтовою кислотою. Смуги білків, які містять залізо, мають червоний колір.

Для отримання якісного забарвлення необхідно використовувати воду, яка не має слідів металів (наприклад, бідистильовану).

2 варіант. Трьохвалентне залізо у складі зазначених білків можна виявити по реакції утворення берлінської лазурі. Цим методом практично не виявляються білки з міцно зв'язаним залізом (так зване замасковане залізо), наприклад, гемоглобін. Зате виявляються білки, що містять більш легко асоційовані іони заліза, наприклад, феритин і трансферин. Тобто є можливість диференціювати білки за міцністю їх зв'язку із залізом. Даний достатньо простий метод одночасно є й високочутливим: за його допомогою можна виявити 0,002–0,1 мкг Fe^{3+} .

Гелі обробляють щойно приготовленою сумішшю рівних об'ємів 2% розчину фероціаніду калію (гексаціаноферату (II) калію,

жовтої кров'яної солі – $K_4[Fe(CN_6)]$) та 2% розчину соляної кислоти протягом 30–60 хвилин (можна довше). Замість фероціаніду калію можна застосовувати також відповідну сіль натрію. Кожні 30 хв суміш замінюють на свіжу. Гель промивають дистильованою водою. Присутність трьохвалентного заліза виявляється через осад темно-блакитного кольору

Можна використовувати інші суміші: рівні об'єми 20% соляної кислоти та 10% фероціаніду натрію; рівні об'єми 5% оцтової кислоти та 2% фероціаніду при температурі +80 °С.

Для стабілізації сполук заліза та зменшення дифузії, що сприяє отриманню на електрофореграмах більш чітких смуг, можна добавляти у забарвлюючий розчин формалін до концентрації 10%.

2.8.3. Ідентифікація ферментів

Активність багатьох ферментів виявляють одразу після закінчення електрофорезу в гелях *in situ*. Багато ферментів можна візуалізувати після електрофорезу неочищених (брутальних, грубих) екстрактів, що забезпечується специфічністю ферментів відносно реакцій, які вони каталізують, та специфічністю методів їх забарвлення на електрофореграмах. У певних випадках немає можливості локалізації ферментної активності безпосередньо у гелях. Тоді гель розрізують уздовж напрямку електрофоретичного розподілу на поперекові фрагменти заданої ширини. Проводять екстракцію матеріалу з отриманих шматочків гелю та визначають активність досліджуваного ферменту звичайними біохімічними методами; можна, якщо це дозволяють умови реакції, також здійснити біохімічний аналіз без попереднього екстрагування.

Перед фарбуванням гелі обполіскують дистильованою водою. Якщо pH гелю суттєво відрізняється від pH середовища, яке є оптимальним для прояву ферментної активності, гель витримують у декількох порціях дистильованої води, а потім у необхідному буфері, поки значення pH не досягне потрібного (значення pH промивного середовища у багатьох випадках достатньо контролювати за допомогою лакмусового папера). Хоча дифузія білків у гелях обмежена, все ж процедуру доведення pH слід здійснювати якомога скоріше, у межах однієї години.

Забарвлення ферментів у гелях *in situ* засновано в основному на гістохімічних методах фарбування тканинних зрізів, тобто на

формуванні кольорових осадів на місці розташування ферменту. Специфічність методу вияву ферментів обумовлена присутністю специфічних субстратів та специфічністю дії самих ферментів.

Існує велика кількість варіантів методів виявлення ферментів. Нижче наведено прописи тільки деяких з них. Спочатку наведено пропис інкубаційних (що забарвлюють) середовищ, потім умови інкубації та коментар до засобу. Допустима зміна методик відповідно власним умовам експерименту. Так, наприклад, у залежності від активності ферменту в досліджуваних зразках можна в інкубаційному середовищі підвищити або зменшити кількість субстрату чи барвника. Можна також оптимізувати значення pH або склад буфера інкубаційного розчину. Для правильного впровадження тих чи інших відмінностей, безумовно, необхідно попередньо ознайомитися в спеціальній літературі з властивостями та особливостями досліджуваного ферменту, визначити необхідність тих чи інших кофакторів для проведення досліджуваної ферментної реакції, з'ясувати, які сполуки інгібують фермент, та інше.

Слід підкреслити, що специфічність вияву ферментів має певні обмеження. Чимало ферментів мають широку субстратну специфічність і тому можуть виявлятися на електрофореграмах одночасно з досліджуваним ферментом. Крім того, використані реактиви можуть мати домішки, які є причиною появи додаткових смуг, що не мають відношення до досліджуваного ферменту.

Перевірку специфічності конкретного методу здійснюють двома основними шляхами: 1) вилученням субстрату з інкубаційного середовища, 2) за допомогою специфічних інгібіторів. Для цього обробляють декілька паралельних зразків: один – фарбують за стандартною методикою, інші – слугують для перевірки специфічності. На основі зіставлення отриманих результатів забарвлення гелів роблять відповідні висновки.

Деякі ферменти (зокрема, фосфатази, естерази) можуть взаємодіяти з різноманітними субстратами. Одночасно ці ферменти, наприклад, фосфатази, виявляють активність у дуже широкому інтервалі значень pH середовища. За своєю сутністю багато з них складають групу дуже подібних, але все ж різних ферментів, тобто не являються ізоформами (варіантами) одного ферменту. При цьому субстратна специфічність окремих ізоформ ферментів може залежати від pH розчину та інших умов. Розмежування окремих, самостійних ферментів такої групи являє собою достатньо складну задачу.

Наприклад, дуже важко розрізняти так звані «неспецифічні» фосфатази від «специфічних» – АТФаз, 5'-нуклеотидази, глюкозо-6-фосфатази і т. ін. Застосування тільки інгібіторів мало у чому допоможе: абсолютно «надійних» специфічних інгібіторів для всіх конкретних ферментів зазначеного типу знайти можна не завжди. У таких випадках досконалий аналіз пов'язано також з паралельним фарбуванням у присутності різних субстратів та за різних значень pH . Це, безумовно, значно ускладнює експеримент, але дозволяє зробити більш-менш достовірні висновки відносно виявлення конкретного ферменту. Тому в досліджах, де необхідно визначити та проаналізувати специфічні форми ферментів такої групи, крім використання двох основних засобів, зазначених вище, слід також варіювати пропис методики фарбування з різними значеннями pH середовища, використовувати різні субстрати та інше, зіставляти результати паралельного фарбування, і тільки на основі такого порівняння робити певні висновки. Для остаточного розв'язання проблеми є необхідним одержання очищеного препарату досліджуваного ферменту та зіставлення його електрофоретичного спектру із спектром, що отримано в результаті аналізу грубого екстракту.

За оптимізації pH інкубаційного середовища слід враховувати також стійкість застосованих компонентів. Так, окиснені форми NAD^+ та $NADP^+$ є достатньо стійкими у кислих розчинах, у лужних – вони швидко руйнуються. Саме тому для виявлення багатьох дегідрогеназ з цієї причини більш придатним можна вважати нейтральне або слабкокислое середовище. Відновлені коферменти, тобто продукт реакції цих ферментів, навпаки, є стійкими у лужних розчинах та нестійкі – у кислих. Значна кількість дегідрогеназ проявляють більш високу активність у лужних середовищах, тому потрібно знаходити таке оптимальне значення pH , яке б відповідало всім вимогам. При цьому, слід вважати також, що у дуже лужних середовищах посилюється спонтанне відновлення тетразолієвих сполук, тобто підвищується неспецифічність забарвлення та загальне затемнення фону гелю.

Більшість реактивів, які застосовуються у гістохімічних реакціях є світлочутливими, тому їх (як сухі речовини, так і розчини) слід оберігати від дії світла. Інкубацію гелів в їх розчинах також потрібно проводити в темряві. До таких сполук відносяться в першу чергу феназинметасульфат, солі diazonію, а також різні тетразолії, нафтоли, феноли та їх похідні.

У буфері для забарвлюючих розчинів рекомендують вводити, якщо це дозволяють властивості ферментів та обраний метод, хелатуючі агенти для того, щоб зв'язати іони важких металів, котрі інгібують більшість ферментів. Частіше за все застосовують ЕДТА до кінцевої концентрації 0,3 мг/мл. Якщо за прописом потрібний ЕДТА, то його вносять у розчин додатково до вищезазначеної кількості.

Іноді виникають високі вимоги до якості води та інших компонентів інкубаційного середовища. Буває необхідним використання демінералізованої (деіонізованої) води (можна застосовувати бидистильовану воду, бажано отриману за допомогою приладів зі скла). Є також потрібним додаткове очищення субстратів чи барвників. Взагалі, на хімічну чистоту компонентів слід звертати увагу, особливо у тих випадках, коли не вдається реалізувати певний метод.

Сполуки тетразолію, зокрема НСТ, важко розчинюються у водних середовищах. Для їх розчинення застосовують або невелику кількість етанолу, диметилформаміду або диметилсульфоксиду, або нагрівання розчину. Розчин тетразолію готують окремо, потім змішують з іншими компонентами.

При використанні в якості забарвлюючого реагенту МТТ до інкубаційного розчину для посилення фарбування можна додавати хлорид кобальту до кінцевої концентрації 25–30 мМ: при фарбуванні виникає контрастний чорний осад комплексу «кобальт–формазан». Необхідну кількість солі кобальту додають до буфера, фільтрують, доводять до потрібного значення pH (хлорид кобальту значно знижує pH розчину), та додають решту реагентів. При цьому слід вважати, що іони кобальту можуть пригнічувати активність певних ферментів, деякі його солі важко розчинюються у воді. Крім того, катіони кобальту не можна вводити у середовище, що містить ціан-аніони (CN^-), оскільки за даних умов виникають комплекси «кобальт–ціанід», які здатні неферментним шляхом швидко відновлювати сіль тетразолію.

Такі реагенти як нафтоли та їх похідні також важко розчиняються у воді або не дають істинних розчинів. Їх також попередньо розчинюють у відповідних органічних розчинниках (ацетон, етанол, диметилформамід, диметилсульфоксид і т. ін.), або нагрівають у водяній бані і потім додають воду. Слід пам'ятати, що кінцева концентрація органічних розчинників у забарвлюючому розчині не повинна перевищувати 0,5–1%.

У разі використання того чи іншого органічного розчинника слід пам'ятати також про можливий вплив його на активність ферментів, вибирати найменш шкідливий та застосовувати по можливості найменшу кількість неводного розчинника.

Для виявлення дегідрогеназ рекомендують вводити в інкубаційне середовище ціаніди калію чи натрію (до кінцевої концентрації у розчині 2,5–5 мМ), азид натрію (до 5–0 мМ), амітал (до 10 мМ), або ЕДТА (до 10–30 мг на 100 мл розчину) та деякі інші сполуки. Основне призначення цих реагентів – пригнічення реакцій окиснення відновлених нікотинамідних кофакторів, виниклих за дії дегідрогеназ.

Гелі після забарвлення за допомогою НСТ та інших тетразоліїв (зокрема, з метою виявлення дегідрогеназ) можна фіксувати при кімнатній температурі у 10% нейтральному формаліні. У деяких прописах рекомендують промивку гелів протягом 15–30 хв у розчині: 160 мл 96% етанолу, 10 мл крижаної оцтової кислоти, 30 мл дистильованої води. Можна не здійснювати фіксацію, а тільки промити гель спочатку дистильованою водою, потім водопровідною.

У разі тривалої витримки гелів у інкубаційному середовищі та тривалої промивки на поверхні гелю може виникати неспецифічний осад надлишків відновлених барвників (наприклад, формазанів), продуктів реакції азосполучення і т. ін. Осад можна видаляти за допомогою м'якого пензлика з наступним промиванням у проточній воді.

Для видалення з гелю бромфенолового синього, якій може заважати забарвленню за деякими прописами, гель обробляють від 5 до 20 хвилин у електродному буфері, що містить 0,01 М $MgCl_2$.

Прописи методів виявлення ферментів розташовані відповідно класу, до якого вони належать згідно з міжнародною біохімічною класифікацією. У середині кожного класу методи розміщено за алфавітним порядком тривіальної назви ферментів. У дужках після назви ферменту наведено його кодний номер (шифр) за номенклатурою ферментів Міжнародного біохімічного союзу, а також систематична назва, у деяких випадках представлені синоніми назви. Після назви наведено схему основної реакції каталізу. Ферменти з широкою специфічністю та ті, що каталізують аналогічні реакції, завдяки чому виявляються однією методикою, як правило, наведені разом. У дужках після тривіальної назви вказано четвертинна структура ферменту, якщо про це є відомості.

На жаль, не є можливим застосування гістохімічних підходів щодо прояву багатьох ферментів. Низка методів потребує введення у склад інкубаційних середовищ у якості додаткових реагентів екзогенних ферментів, що значно знижує їх доступність. Більшість таких методів не приведено.

Для низки методів наведено декілька варіантів (особливо для ферментів з широкою субстратною специфічністю). Справа експериментатора підібрати найбільш оптимальний варіант, якій відповідає особливостям досліджуваного матеріалу, меті та можливостям виконавця.

Необхідно пам'ятати, що багато гістохімічних барвників відносяться до категорії токсичних, тому у разі їх застосування слід обов'язково виконувати запобіжні заходи. Зокрема, рекомендується в процесі роботи з гелем (виготовлення, перенесення у різні розчини та його забарвлення) користатися гумовими рукавичками. Це буде певним чином захищати дослідника від отрутних сполук та запобігати забрудненню гелів речовинами, в першу чергу ферментами, які знаходяться на шкірі рук, і можуть порушити процес забарвлення.

Докладну інформацію про методи та механізми, що лежать в основі виявлення ферментів на електрофореграмах, можна знайти у посібнику Г. П. Манченко [Manchenko, 2003].

КЛАС 1. ОКСИДОРЕДУКТАЗИ

Алкогольдегідрогеназа (димер)

(КФ 1.1.1.1 Алкоголь: NAD–оксидоредуктаза)

Алкоголь + NAD⁺ → альдегід, або кетон + NADH

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,1 – 15 мл; NAD⁺ – 50 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 0,1 М *NaCN* – 5 мл; 96% етанол – 3 мл; вода – до 100 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,0 – 95 мл; NAD⁺ – 7 мг; НСТ – 8 мг; ФМС – 3 мг; 0,5 М *KCN* – 5 мл; 96% етанол – 0,6 мл.

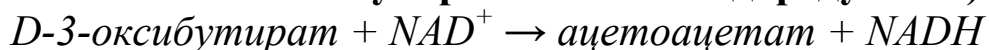
Етанол додають безпосередньо до інкубації. Для певних об'єктів більш ефективним субстратом ферменту може бути ізопропанол, бутанол або октанол. Замість ціанідів можна застосувати азид натрію, амітал або ЕДТА. Гелі інкубують у розчині з температурою 30–37 °С до появи темно-синіх смуг формазану у місцях локалізації ферменту.

Алкогольдегідрогеназа – фермент з широкою специфічністю, тому може виявлятися у присутності маніту, α -гліцерофосфату, гіпоксантину, глутамату, тобто за проявом інших дегідрогеназ.

Специфічний інгібітор алкогольдегідрогенази – піразол (1 мг/мл). Неспецифічний прояв ферменту (виявлення інших дегідрогеназ) можна також інгібувати за допомогою хлористого кальцію (2 мг/мл і більше). Алкогольдегідрогеназа інгібується також гідроксиламінгідрохлоридом (хлоридом гідроксиламонію). Активність дріжджової алкогольдегідрогенази пригнічується тетраетилтиурамдисульфідом (антабусом).

β -Гідроксибутиратдегідрогеназа. Оксibuтиратдегідрогеназа (димер)

(КФ 1.1.1.30 D-3-оксibuтират: NAD-оксидоредуктаза)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,5 М фосфатний буфер, *pH* 7,4 – 25 мл; NAD^+ – 100 мг; НСТ – 25 мг; ФМС – 2,5 мг; $MgCl_2$ – 10 мг; $NaCl$ – 575 мг; 1 М розчин β -гідроксибутирату – 10 мл; вода – до 100 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,06 М фосфатний буфер (або 0,2 М Трис- HCl буфер), *pH* 7,0 – 25 мл; 0,5 М розчин хлориду кобальту – 5 мл; 0,1 – 1,0 М розчин NAD^+ – 10 мл; МТТ – 25 мг; 0,05 М розчин $MgCl_2$ – 10 мл; 0,1 М розчин азиду натрію – 10 мл; 1 М розчин β -гідроксибутирату – 10 мл; вода – до 100 мл.

Інкубація в темряві за температури 37 °С до появи темно-синіх, або чорних (за варіантом 2) смуг у місцях локалізації ферменту.

Ні з α -, ні з L- β -ізомерами гідроксибутирату в якості субстратів реакція не йде. В зв'язку з тим, що між двома ізомерами немає конкуренції, замість D-ізомеру можна використати рацемічну суміш β -гідроксибутирату.

Гліцерат-2-дегідрогеназа (димер)

(КФ 1.1.1.29 D-Гліцерат-2: НАД-оксидоредуктаза)



Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис- HCl буфер, *pH* 8,0 – 50 мл; NAD^+ – 20 мг; МТТ – 20 мг; ФМС – 2 мг; D, L-гліцерина кислота – 500 мг.

Гель інкубують при +30 °С протягом ночі.

α-Гліцерофосфатдегідрогеназа (димер)

(КФ 1.1.1.8 L-Гліцерол-3-фосфат: NAD-2-оксидоредуктаза)

L-Гліцерол-3-фосфат + НАД⁺ → гідроксиацетонфосфат + NADH

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,1 – 15 мл; NAD⁺ – 50 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 0,1 М *NaCN* – 5 мл; 1 М α-гліцерофосфат натрію – 10 мл; вода – 70 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,5 М фосфатний буфер, *pH* 7,4 – 10 мл; NAD⁺ – 100 мг; НСТ – 50 мг; ФМС – 4 мг; 1 М α-гліцерофосфат натрію – 10 мл; вода – 160 мл.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,5 – 90 мл; NAD⁺ – 40 мг; НСТ – 20 мг; ФМС – 1 мг; натрієва сіль ЕДТА – 180 мг; α-гліцерофосфат натрію × 5 *H₂O* – 800 мг.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,5 – 100 мл; NAD⁺ – 20 мг; НСТ – 20 мг; ФМС – 2,4 мг; α-гліцерофосфат натрію – 200 мг.

Спочатку розчиняють у буфері субстрат, доводять *pH* до необхідного значення, потім додають решту реагентів. Температура інкубації – від 20 до 37 °С. У зонах розміщення ферменту з'являється темно-синє забарвлення.

Фермент не реагує з β-ізомером гліцерофосфату.

Потрібен контроль на алкогольдегідрогеназу.

Глутаматдегідрогеназа

(у тварин – димер, у рослин – гексамер)

(КФ 1.4.1.2 L-Глутамат: NAD-оксидоредуктаза, дезамінуюча)

L-Глутамат + H₂O + NAD⁺ → 2-оксоглутарат + NH₃ + NADH

У деяких об'єктів можливий одночасний прояв також L-глутаматоксидазної активності

Глутаматоксидаза (гетеротетрамер)

(КФ 1.4.3.11 L-Глутамат: кисень-оксидоредуктаза, дезамінуюча)

2 L-Глутамат + O₂ + H₂O → 2-оксоглутарат + 2 NH₃ + H₂O₂

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,3; NAD⁺ – 20 мг; НСТ – 9 мг; ФМС – 3 мг; *CaCl₂* – 200 мг; 1 М глутамат натрію – 5 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,5 М фосфатний буфер, *pH* 7,0 – 25 мл; NAD⁺ – 60 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 1 М

глутамат натрію – 5 мл; вода – 70 мл. Можна додати до середовища хлорид магнію до кінцевої концентрації 5 мМ.

Умови інкубації: темрява, 30–37 °С.

Фермент інгібується 1,10-фенантроліном (*o*-фенантроліном) у концентрації 1 мкМ (0,2 мг у літрі), а також 5-хлорфуран-2-карбоною кислотою.

Потрібен контроль на алкогольдегідрогеназу. Для контролю на глутаматоксидазну активність із середовища виключають НАД⁺.

Глутатіонредуктаза (димер)

(КФ 1.6.4.2 NADH: глутатіон–оксидоредуктаза)

NAD(P)H + глутатіон окиснений → NAD(P)⁺ + 2-глутатіон відновлений

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,25 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,5; 3,4 мМ глутатіон окиснений; 0,5 мМ відновлений NADPH; 3 мМ ЕДТА; 0,2 мг/мл 2,6-дихлорфеноліндофенол; 0,2 мг/мл МТТ.

Інкубують у темряві до появи забарвлених смуг у зоні розташування ферменту.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,0 – 50 мл; NADH – 35 мг; 5,5-дитіо-*bis*-2-нітробензойна кислота – 350 мг; ЕДТА – 1,25 г; глутатіон окиснений – 350 мг; агар – 0,75 – 1 г; вода – 50 мл.

Окремо розплавляють у воді агар. У буфері розчиняють ЕДТА і дитіо-*bis*-2-нітробензойну кислоту та змішують з гарячим розчином агару. Суміш охолоджують до +45 °С, після чого додають глутатіон та відновлений NADP. Теплою сумішшю покривають поверхню гелю та інкубують 1–2 години у темряві при температурі +37 °С. У зонах розташування ферменту спостерігається жовте забарвлення.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,3 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,0 – 10 мл; NADPH – 7 мг; глутатіон окиснений – 30 мг; 2% розчин агару (45 °С) – 10 мл.

Теплою сумішшю покривають поверхню гелю та інкубують при +37 °С.

Гель аналізують в ультрафіолетовому світлі. На місцях розміщення ферменту виявляються темні смуги на фоні гелю, що світиться.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: 0,25 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,4 – 20 мл; NADPH – 10 мг; глутатіон окиснений – 40 мг; 2,6-дихлорфеноліндофенол – 0,2 мг, МТТ – 10 мг, ФАД – 2 мг. Інкубують

у темряві до появи пурпурових смуг на блакитному фоні. Потім гель промивають 1 М НСІ для знищення блакитного фону та фіксують у 25% етанолі.

**Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа (мономер, димер, тетрамер)
(КФ 1.1.1.49 D-глюкозо-6-фосфат: NADP-1-оксидоредуктаза)**
D-Глюкозо-6-фосфат + NADP⁺ → D-глюкозо-δ-лактон-6-фосфат + NADPH

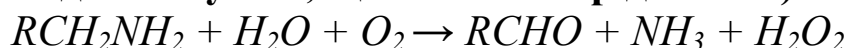
Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-НСІ буфер, рН 8,3 – 50 мл; NADP⁺ – 20 мг; НСТ – 20 мг; ФМС – 2 мг; глюкозо-6-фосфат натрієва сіль – 75 мг; вода – 50 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,04 М Трис-НСІ буфер, рН 7,1 – 100 мл; NADP⁺ – 4 мг; МТТ – 10 мг; ФМС – 2 мг; глюкозо-6-фосфат натрієва сіль – 14 мг; 1 М MgCl₂ × 6 H₂O – 0,5 мл.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис-НСІ буфер, рН 7,1 – 25 мл; NADP⁺ – 30 мг; НСТ – 20 мг; ФМС – 2 мг; глюкозо-6-фосфат натрієва сіль – 200 мг; вода – 90 мл.

Гель інкубують у темряві при температурі 30–37 °С. Для пригнічення активності фосфатаз у розчин можна додати фтористий натрій до кінцевої концентрації 0,5 мМ.

**Діаміноксидаза. Гістаміназа (димер)
(КФ 1.4.3.6. Амін: кисень-оксидоредуктаза
дезамінуюча, що містить пірідоксаль)**



Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,6 – 25 мл; сульфат натрію – 20 мг; НСТ – 25 мг; ФМС – 5 мг; гістамін×НСІ – 125 мг; дистильована вода – 75 мл.

Гель інкубують у темряві, +37 °С до появи синіх смуг ферменту. Промивають водою.

Діаміноксидаза окиснює також путресцин, кадаверин, агматин та значно повільніше – низку ароматичних моноамінів (тирамін, триптамін, адреналін та інші).

Інгібіторами діаміноксидази є паргілін, транилципримін, хармін; її активність пригнічують також семікарбазид, ціанід, гідроксиламін, ізоніазид, гідразин, діетилдитіокарбамаат (у кінцевій концентрації 1–10 мМ), а також фосфат ізонікотинил-2-ізопропилгідразин (марсилід) і бензедрин (α-метилтирамін). Ізопропилгідразин у концентрації 0,001 мкМ (0,074 мкг/л) інгібує діаміноксидазу, не впливаючи при

цьому на активність моноаміноксидази. Зазначені два ферменти подібні згідно з реакціями, які вони каталізують. Додаткові відомості про їх диференціацію наведено у коментарях до методу виявлення моноаміноксидази.

Активаторами діаміноксидази є іони міді, кобальту і особливо цинку.

Діафораза. Ліпоамід-дегідрогеназа. Ліпоїлдегідрогеназа
(мономер, димер)

(КФ 1.6.4.3 NADH: ліпоамід–оксидоредуктаза)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,025 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,0 – 8,5 – 50 мл; NADH – 10 мг; МТТ – 7,5 мг; 0,1% розчин дихлорфеноліндофенолу – 1 мл. Розчин акцептора протонів (дихлорфеноліндофенолу) має бути свіжо виготовленим і фільтрованим.

Гель інкубують у темряві при 30 °С до появи забарвлених смуг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,05 М фосфатний буфер, *pH* 7,4 – 50 мл; NADH – 5 мг; дихлорфеноліндофенол – 2 мг.

Гель інкубують 30 хвилин при 37 °С. Розчин зливають, гель переносять на скло. На світло-синьому фоні з'являються білі смуги, які показують зони локалізації ферменту. Забарвлення не є дуже контрастним і стійким, зберігається до 2–3 годин.

У першому варіанті замість дихлорфеноліндофенолу можна застосовувати інші редокс-барвники: метиленовий синій, азур С, азур I, піоціанин, нільський блакитний А, ФМС (до кінцевої концентрації 0,08–0,09 мг %).

Замість МТТ можна використовувати також НСТ, хлорид неотетразолію та інші тетразолієві сполуки. Найбільш прийнятні результати дає сполучення в інкубаційному середовищі тетразоліїв з ФМС.

Деякі форми діафрази можуть використовувати в якості субстрату також відновлений NADPH.

При виявленні діафраз виникає низка проблем, що мають різні причини. Незважаючи на те, що ФМС є одним з найбільш ефективних переносників електронів від ферментів до кисню та інших акцепторів, його застосування у даному випадку обмежується завдяки тому, що ФМС може відновлюватися неензиматичним шляхом субстратами ферментів (відновлені NADH та NADPH). Крім

того, слід враховувати, що редокс-барвники (особливо ФМС) дуже легко відновлюються іншими флавопротеїновими оксидоредуктазами, в першу чергу сукцинатдегідрогеназою. Тому, для запобігання неспецифічного забарвлення та фальшивого вияву форм ферменту, необхідні додаткові контрольні експерименти з використанням різних інгібіторів, акцепторів водню тощо.

Для диференціювання діафораз і NAD(P)H-оксидаз можна враховувати наступні особливості діафораз:

1) діафорирази переносять водень від субстрату на будь-яку неприродну речовину (метиленава синь та інший барвник),

2) діафорирази не здатні відновлювати цитохром *c* (від Fe^{3+} до Fe^{2+}),

3) вони не інгібуються 2,3-димеркаптопропанолом, *o*-фенантролином, 8-оксихіноліном та іншими реагентами, які зв'язують залізо, оскільки містять його у своєму складі у 6 разів менше, ніж NAD(P)H-оксидази.

NAD(P)H-оксидазна активність у серцевому м'язі ссавців інгібується дикумаролом (0,01 мМ, тобто 3,4 мг / л).

Ціаніди не впливають на активність цих ферментів.

DT-Діафориаза. Менадіонредуктаза. Хінонредуктаза.

NAD(P)-дегідрогеназа (хінон) (димер, тетраметр)

(КФ 1.6.99.2 NAD(P)H: (хінон-акцептор) – оксидоредуктаза)

NAD(P)H · H + акцептор → NAD(P)⁺ + відновлений акцептор

Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,0 – 75 мл; NADH – 25 мг; НСТ – 7,5 мг; менадіон – 20 мг.

Гель інкубують у темряві при температурі 30–37 °С до появи смуг темно-синього кольору.

Фермент інгібується дикумаролом.

o-Дифенолоксидаза. Катехолоксидаза. Поліфенолоксидаза **(мономер, димер)**

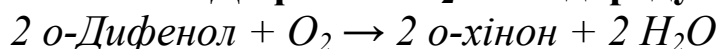
(КФ 1.14.18.1 Монофенол, дигідроксифенилаланин: кисень – оксидоредуктаза),

Тирозин + дигідроксифенилаланин + O₂ →
→ дигідроксифенилаланин + диоксофенилаланин + H₂O

Група фенолоксидаз містить неоднотипні ферменти, які катализують хімічні реакції, що дещо різняться між собою. Віднесення класичних *o*- та *n*-дифенолоксидаз до даної групи

ферментів є суперечливим, тому нижче наведена початкова класифікація

(КФ 1.10.3.1 *o*-Дифенол: O₂-оксидоредуктаза)



Під назвою катехолоксидази відомий також інший фермент, що окиснює за допомогою кисню феноли та споріднені сполуки, та може проявлятися нижченаведеними методами.

(КФ 1.1.3.14 Катехол: O₂-оксидоредуктаза, димеризуюча)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 7,0 – 85,8 мл; 0,01 М *L*-пролін – 7,1 мл; 0,01 М пірокатехін – 7,1 мл.

Для отримання 0,01 М розчину проліну до 100 мл води додають 115 мг реагенту; для виготовлення 0,01 М розчину пірокатехіну необхідно 110 мг реагенту на 100 мл води.

Інкубують у темряві при 30–37 °С до появи помаранчевих смуг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,02 М ацетатний буфер, *pH* 4,2 – 100 мл; пірокатехін – 110 мг.

Інкубують при кімнатній температурі (звичайно протягом ночі) до появи темно-коричневих смуг катехолмеланіну у зонах локалізації ферменту.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,01 М фосфатний буфер, *pH* 6,8 – 100 мл; сульфанілова кислота – 50 мг; пірокатехін – 15 мг.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: 0,1 М ацетатний буфер, *pH* 5,7 – 100 мл; *o*-дианізидін – 500 мг. Субстрат (*o*-дианізидін) розчиняють у 5 мл 96% етанолу.

Гель витримують при 30–37 °С. У зонах розміщення ферменту з'являється яскраво-рожеве забарвлення на світло-бузковому фоні.

Варіант 5. Гель витримують у темряві 30 хвилин при кімнатній температурі (або за +37 °С) у 0,01% розчині *N,N*-диметил-*n*-фенілендіаміну у 0,01 М калій-фосфатному буфері, *pH* 7,8 (див. виявлення супероксиддисмутази). Потім розчин зливають, гель обполіскують дистильованою водою та заливають 1% розчином пірокатехіну у тому ж буфері. Інкубацію провадять за тих ж умов до появи темно-бурих смуг ферменту на світлому фоні.

Для посилення та прискорення процедури забарвлення можна в останній розчин додати 0,5 мл 0,5 М *CuSO*₄ на 100 мл розчину. Однак, це необхідно здійснювати дуже обережно та постійно

контролювати хід фарбування, щоб не допустити інтенсивного неспецифічного затемнення фону.

Варіант 6. Гель витримують 30 хвилин у розчині 2 – 3 мМ хлорогенової кислоти, промивають водою. Потім витримують у 0,05% розчині *n*-фенілендіаміну до появи забарвлених смуг. Розчини можна готувати на будь-яких буферах з *pH* 7,5 – 7,8.

Варіант 7. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 7,3 – 7,4 – 100 мл; 3,4-диоксифенілаланін – 100 мг.

Гель інкубують у темряві при 20–37 °С протягом декількох годин до появи коричнево-чорних смуг. Субстрат самостійно легко окиснюється, тому інкубаційний розчин слід змінювати 1–2 рази.

Варіант 8. Інкубаційний розчин: 0,05% розчин тирозину у 0,01 М калій-фосфатному буфері, *pH* 7,8. Для готування розчину 125 мг тирозину розчиняють у 50 мл 2% Na_2CO_3 при температурі 40 – 50 °С та доводять буфером до об'єму 250 мл.

Гель витримують у розчині субстрату при кімнатній температурі (або при 37 °С) до появи темно забарвлених смуг.

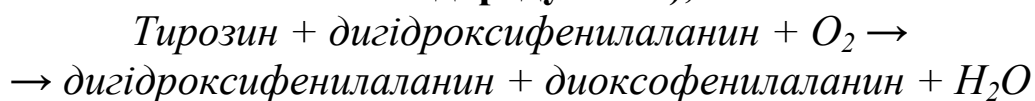
Активність *o*-дифенолоксидази до тирозину, тобто гідроксилювання (оксигенація) монооксифенолів, виявляється не у всіх об'єктів та не в будь-яких випадках. Дана реакція може здійснюватися дуже повільно. Є вказівки на те, що зазначена активність ферменту легко знищується, якщо провадять екстракцію ферменту за допомогою неіонних детергентів. Крім тирозину можна скористатися *n*-кумаровою кислотою, *n*-крезолом, *n*-оксибензоїною кислотою, *n*-оксибензальдегідом, *n*-оксиацетофенолом, тираміном, *n*-оксифенілаланіном, дигідрохалконами (наприклад, флорідзином) та іншими реагентами.

o-Дифенолоксидаза інгібується ціанідом, сульфідом, азидом у кінцевій концентрації 1–5 мМ. Цей фермент, як і цитохромоксидаза, пероксидаза, аскорбінатоксидаза, каталаза та деякі інші оксидази, пригноблює активність дією оксиду вуглецю (*CO*). Однак, на відміну від них, щодо *o*-дифенолоксидази таке інгібування не є оборотним, та активність ферменту не відновлюється при освітленні. 2-Меркаптобензтіазол інгібує фенолоксидазу при низьких концентраціях – від 0,01 до 20 мкМ (від 2 мкг до 4 мг у літрі). Фенілтіосечовина також інгібує фермент.

Даний фермент є термостабільним.

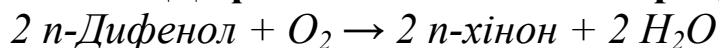
***n*-Дифенолоксидаза. Лакказа. Поліфенолоксидаза. Церулоплазмін
(мономер)**

**(КФ 1.14.18.1 Монофенол, дигідроксифенилаланин: кисень –
оксидоредуктаза),**



Група фенолоксидаз містить неоднотипні ферменти, які катализують хімічні реакції, що дещо різняться між собою. Віднесення класичних *o*- та *n*-дифенолоксидаз до даної групи ферментів є суперечливим, тому нижче наведено початкову класифікацію.

(КФ 1.10.3.2 *n*-Дифенол: кисень–оксидоредуктаза)



Інкубаційний розчин: 0,1 М ацетатний буфер, рН 5,7 – 100 мл; *n*-фенілендіамін – 21,6 мг.

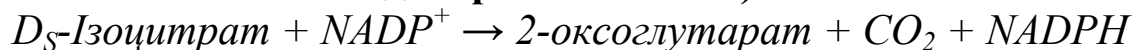
Інкубують при 37 °С до появи синє-фіолетового забарвлення смуг ферменту. Гелі фіксують та відмивають у розчині наступного складу: 50 мл 0,2 М розчину ацетату натрію, 50 мл 0,2 М розчину оцтової кислоти, 100 мл 50% етанолу.

Крім похідних діамінів фермент окиснює різні *n*-оксифеноли (наприклад, гідрохінон). Від *o*-дифенолоксидази *n*-дифенолоксидаза відрізняється наступним:

- 1) немає активності до монофенолів;
- 2) здатна окиснювати *n*-оксифеноли;
- 3) не реагує з СО як у темряві, так і в умовах освітлення.

***Ізоцитратдегідрогеназа* (димер)**

**(КФ 1.1.1.42 D_S-Ізоцитрат: NADP–оксидоредуктаза,
декарбоксилююча)**



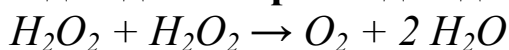
Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-НCl буфер, рН 8,0 – 90 мл; NADP⁺ – 20 мг; НСТ – 10 мг; ФМС – 3 мг; 0,25 М розчин MnCl₂ – 0,4 мл; 0,1 М розчин ізоцитрату натрію – 3 мл; дистильована вода – 30 мл.

Умови інкубації: темрява, 30–37 °С до появи темно-синіх смуг у місцях розташування ферменту (1–2 години).

NAD-залежна ізоцитратдегідрогеназа – гетеродимер (рослини, ссавці), октамер (дріжджі).

Каталаза (тетраметр)

(КФ 1.11.1.6 Пероксид водню: пероксид водню–оксидоредуктаза)



Варіант 1. Гель витримують 7–10 хвилин у 0,01% розчині H_2O_2 . Швидко обполіскують дистильованою водою та заливають на 5 хвилин забарвлюючим розчином, після чого промивають водою.

Забарвлюючий розчин: вода – 50 мл, феріціанід калію (гексаціаноферат (III) калію, червона кров'яна сіль – $K_3[Fe(CN_6)]$) – 500 мг, $FeCl_3$ – 500 мг.

Каталазна активність виявляється у вигляді білих смуг на темно-синьому фоні. Гелі бажано документувати одразу після фарбування.

Варіант 2. Даній засіб застосовують після розділення ферменту у крохмальному гелі. Якщо використовують ПААГ, то у склад розчину робочого гелю вводять розчинний крохмаль до 0,3–0,5%.

Вихідні розчини: А) 5 мл 3% H_2O_2 + 10 мл 0,1 М фосфатного буферу, pH 7,0 + 7 мл 0,06 М $Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$ + 78 мл дистильованої води; Б) 100 мл 0,045 М KJ + 10 крапель крижаної оцтової кислоти.

Гель інкубують у розчині А при кімнатній температурі 1–15 хвилин. Потім розчин А зливають, гель швидко промивають дистильованою водою та заливають розчином Б. При цьому гель можна охолоджувати 20 хвилин у холодильнику, що сприяє більш якісному виявленню смуг. Зони каталазної активності виглядають як білі смуги на синьому фоні. Гелі бажано документувати одразу після фарбування.

Крім залізо-зв'язуючих сполук (ціаніди, азиди, сульфіді, гідроксиламін), каталаза інгібується підвищеними концентраціями аніонів у середовищі: нітратами (найбільш сильне гальмування), ацетатами, фосфатами, сульфатами, іонами хлору. Кислоти також блокують активність ферменту, наприклад, мурашина кислота у кінцевій концентрації 0,02 М практично повністю інактивує каталазу.

Ксантиндегідрогеназа (димер)

(КФ 1.2.1.37 Ксантин: NAD–оксидоредуктаза)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис- HCl буфер, pH 7,1 – 20 мл; NAD^+ – 60 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 1 М гіпоксантин – 3 мл; вода – до 100 мл. Для приготування розчину 1 М гіпоксантину 13,6 г розводять у 20 мл 1 М KOH та доводять об'єм до 100 мл.

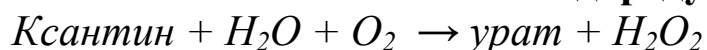
Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,06 М $LiOH$ / 0,3 М H_3BO_3 буфер, pH 8,1 – 50 мл; NAD^+ – 5 мг; НСТ – 10 мг; ФМС – 2 – 5 мг; гіпоксантин – 10 мг. Гіпоксантин нагрівають у буфері до розчинення, після охолодження до кімнатної температури розчиняють решту реактивів. Замість літій-боратного буфера можна застосовувати 0,005 М Трис-цитратний буфер, pH 7,5.

Умови інкубації: темрява, 30–37 °С.

Потрібен контроль на алкогольдегідрогеназу.

Ксантиноксидаза (гетеротример, димер)

(КФ 1.2.3.2 Ксантин: кисень –оксидоредуктаза)



Інкубаційний розчин: 0,02 М пірофосфат-натрієвий буфер, pH 8,8 – 50 мл; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; гіпоксантин – 18 мг.

Умови інкубації: темрява, 30 – 37 °С.

Замість гіпоксантину для прояву ксантиндегідрогенази та ксантиноксидази можна використовувати ксантин, пурін, ацетальдегід, бензальдегід, саліцилальдегід.

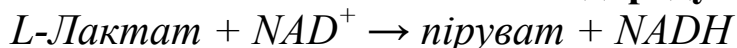
Аскорбінова кислота, дитіотреїтол, глутатіон активують ксантиноксидазу у кінцевій концентрації 0,25 мМ (діапазон від 0,15 до 0,40 мМ), а цистеїн – біля 1 мМ. При підвищенні концентрації вищезазначених сполук відбувається гальмування активності ферменту цими ж реагентами. Ксантиндегідрогеназа, навпаки, інгібується вище зазначеними сполуками вже у концентрації 0,1 мМ.

Кортикостероїди, кофеїн, фолієва кислота, гістидин інгібують як ксантиноксидазну, так і ксантиндегідрогеназну активність.

6-Птеридилальдегід (2-аміно-4-гідрокси-6-формілптеридин) при концентрації 0,001 мкМ (0,2 мкг у літрі) інгібує ксантиноксидазу молока.

Лактатдегідрогеназа (мономер, димер, тетрамер)

(КФ 1.1.1.27 L-Лактат: NAD –оксидоредуктаза)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,03 М Трис- HCl буфер, pH 7,1 – 85 мл; NAD^+ – 50 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 0,1 М KCN – 5 мл; 1 М лактат натрію, pH 7,0 – 10 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,5 М фосфатний буфер, pH 7,4 – 100 мл; NAD^+ – 20 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 1 М лактат натрію або літію – 180 мг.

Деякі автори додають до 100 мл інкубаційного розчину 1 мл 1 М хлористого магнію.

Для отримання 1 М розчину лактату натрію до 10,6 мл 85% *DL*-молочної кислоти поступово додають 100 мл води та 49 мл 1 М Na_2CO_3 .

Гель інкубують при 30–37 °С до появи темно-синіх смуг.

Ізоформи ферменту відрізняються чутливістю до обробки сечовиною, ступенем інгібування сульфітом, рівнем оптимальної концентрації субстрату для прояву активності. Дані особливості можна використати для додаткового диференціювання форм лактатдегідрогенази.

Оксамінова кислота у концентрації 10 мкМ (0,9 мг у літрі) інгібує каталіз ферментом зворотної реакції шляхом конкуренції з піруватом.

Малатдегідрогеназа (NAD-залежна) (димер)
(КФ 1.1.1.37 L-малат: NAD-оксидоредуктаза)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-*HCl* буфер, рН 8,5 – 90 мл; NAD^+ – 10 мг; МТТ – 15 мг; ФМС – 4 мг; 1 М малат натрію, рН 7,0 – 10 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис-*HCl* буфер, рН 7,1 – 15 мл; NAD^+ – 50 мг; НСТ – 30 мг; ФМС – 2 мг; 0,1 М $NaCN$ – 5 мл; 1 М малат натрію, рН 7,0 – 10 мл; вода – 70 мл.

Для отримання 1 М розчину малату натрію 13,4 г L-яблучної кислоти розчиняють у 100 мл води і поступово приливають 49 мл 2 М Na_2CO_3 .

Гелі витримують у забарвлюючому розчині в темряві при температурі 30 – 37 °С до виникнення темно-синіх смуг.

Фермент конкурентно інгібує β-фторщавелевооцтова кислота (1-фторо-2-оксоянтарна кислота) у концентрації 1 мМ (150 мг/л).

Малатдегідрогеназа (NADP-залежна) (мономер, димер, тетрамер)

Малік-ензим . Малатдегідрогеназа декарбоксилуюча
(КФ 1.1.1.40 L-малат: NADP-оксидоредуктаза, декарбоксилуюча оксалоацетат)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,3 – 100 мл; NADP^+ – 20 мг; НСТ – 15 мг; ФМС – 3 мг; ЕДТА – 30 мг; 1 М малат натрію, *pH* 7,0 – 3 мл; 1 М $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2 мл.

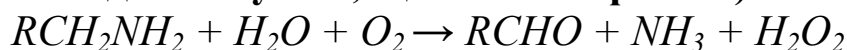
Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,1 – 50 мл; NADP^+ – 20 мг; НСТ – 15 мг; ФМС – 5 мг; 1 М малат натрію, *pH* 7,0 – 15 мл; 0,25 М $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мл.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,05 М триетаноламіновий буфер, *pH* 7,6 – 100 мл; NADP^+ – 145 мг; НСТ – 160 мг; ФМС – 6 мг; ЕДТО – 170 мг; 1 М малат натрію, *pH* 7,0 – 5 мл; хлористий магній безводний – 75 мг.

Інкубація (від 30 хвилин до декількох годин) у темряві при температурі 30–37 °С до появи темно-синіх смуг.

Моноаміноксидаза. Тираміназа (димер, гексамер)

(КФ 1.4.3.4. Амін: кисень –оксидоредуктаза, дезамінуюча, що містить флавін)



Можливе одночасне виявлення і тіраміноксидази.

(КФ 1.4.3.9 Тирамін: кисень –оксидоредуктаза, дезамінуюча)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 7,6 – 25 мл; сульфат натрію – 20 мг; НСТ – 25 мг; триптамін×*HCl* – 125 мг; дистильована вода – 75 мл.

Гель інкубують у темряві, 37 °С до появи синіх смуг ферменту (30 – 45 хвилин). Промивають водою.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: фосфатний буфер, *pH* 7,4–7,6 – 45 мл; 1 М *NaOH* – 0,45 мл; 40% розчин ацетату натрію – 22,5 мл; 0,005% розчин гідрозиду 2-окси-3-нафтоїної кислоти – 9 мл; 0,1 М триптамін×*HCl* – 3 мл; дистильована вода – 4,05 мл. Розчин гідрозиду нафтоїної кислоти готують у 5% оцтовій кислоті. Для прискорення розчинення суміш нагрівають до 70 °С. Розчин триптаміну додають наприкінці.

Для більш ефективного фарбування інкубаційний розчин перед використанням насичують киснем.

Гель витримують 1–2 години при температурі 37 °С, можлива поява у місцях локалізації ферменту світло-жовтого забарвлення. Розчин зливають і гель промивають дистильованою водою. Потім гель занурюють на декілька хвилин для «прояву» забарвлення у 0,5% розчин міцного синього *B* у буфері з *pH* 8,0. Фермент виявляється

бузково-синім забарвленням. Гель після промивання дистильованою водою можна фіксувати в 10% формаліні.

Оптимум *pH* ферменту знаходиться в інтервалі від 7,0 до 8,0. Моноаміноксидаза може ефективно окиснювати також тирамін, адреналін, серотонін, горденін та інші ароматичні аміни, а також аліфатичні аміни з довгим вуглецевим ланцюгом (бутиламін, аміламін і т. д). Особливо енергійно фермент взаємодіє з тираміном і адреналіном.

Інгібіторами моноаміноксидази є паргілін, транилципримін, хармін, атабрин; її активність пригнічує також семікарбазід, ціанід, гідроксиламін, ізоніазид, гідразин, діетилдитіокарбамат (у кінцевої концентрації 1–10 мМ), а також фосфат ізонікотинил-2-ізопропилгідразин (марсилід) і бензедрин (α -метилтирамін). Спирти, у тому числі етиловий, також пригнічують активність ферменту. Сечовина (3 М) необоротно інгібує моноаміноксидазу.

Моноаміноксидаза та діаміноксидаза здатні каталізувати окиснення низки спільних субстратів. Для їх розрізнення можна скористатися декількома особливостями досліджуваних ферментів. 2-фенілциклопропиламіногідрохлорид (*SKF*) практично необоротно інгібує моноаміноксидазу (0,1 мкМ, 17 мкг/л), але не впливає на діаміноксидазу. На відміну від діаміноксидази моноаміноксидаза чутлива до підвищеної температури: так, очищений препарат моноаміноксидази з печінки бика втрачає половину активності у разі нагрівання до 50 °С протягом 5 хвилин. Діаміноксидаза витримує без утрати нативного стану нагрівання до 58–60 °С не менш 10 хвилин. Активаторами ферменту являються іони міді, кобальту і особливо цинку.

***NADH*-дегідрогеназа. *NADH*-оксидаза (мономер, димер)**

(КФ 1.6.99.3 *NADH*: акцептор–оксидоредуктаза)

(старий номер 1.6.2.1)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,3 – 50 мл; НСТ – 20 мг; *NADH* – 25 мг. Деякі автори рекомендують також додавати у суміш ФАД (8 мг на 100 мл).

Інкубація в темряві при 37 °С до появи темно-синіх смуг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,0 – 7,4 – 65 мл; 0,1 М цитрат натрію – 5 мл; 30 мМ сульфат міді – 10 мл;

5 мМ феріціанід калію (червона кров'яна сіль) – 10 мл; NADH – 25 мг; вода – до 100 мл.

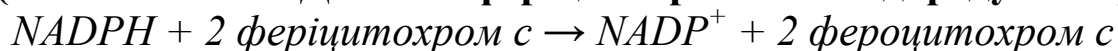
Інкубують при кімнатній температурі, у випадку неспецифічного забарвлення гелю – у холодильнику (2–4 °С) до появи коричневих смуг фероціаніду міді.

Досліджуваний фермент важко відрізнити від діафораз, які діють на той ж субстрат в аналогічному середовищі (див. коментар до виявлення діафораз). Антиміцин А пригнічує окиснення відновленого піридиннуклеотиду ферментом, отриманим з мітохондрій. Фермент інгібується також аміталом (1 мМ). Ферменти з мікросом та гомогенатів м'язів не чутливі до антиміцину та не приймають участь у процесах фосфорилування. Ціаніди не впливають на їх активність.

NADH-оксидазна активність у серцевому м'язі інгібується дикумаролом (0,01 мМ, тобто 3,4 мг/л).

NADPH-дегідрогеназа. NADPH-оксидаза (мономер)

(КФ 1.6.2.4 НАДФН·Н: феріцитохром с–оксидоредуктаза)



Фермент виявляють за такою ж методикою, як й NADH-дегідрогеназу; замість NADH у розчин додають таку ж кількість NADPH.

Фермент дуже нестійкий в умовах низьких *pH* та нагрівання.

Пероксидаза (мономер)

(КФ 1.11.1.7 Донор: пероксид водню–оксидоредуктаза)



Варіант 1. Готування розчину для фарбування. Біля 100 мл води нагрівають до 60 °С та додають 2,3 мл крижаної оцтової кислоти, 160 мг бензидину і 5,45 г ацетату натрію. Після розчинення всіх компонентів рідину охолоджують до кімнатної температури та доводять водою до об'єму 200 мл.

Гель витримують у розчині для фарбування 20–30 хвилин, після чого розчин зливають (розчин для фарбування можна використати ще 1–2 рази). Гель обполіскують водою та занурюють у 0,03% водний розчин H_2O_2 . Через декілька хвилин ізоформи ферменту проявляються у вигляді яскраво-синіх смуг, котрі потім набувають бурого кольору.

Після прояву смуг ферменту гель промивають водою. Для закріплення та посилення забарвлення гелі витримують протягом ночі (добі) у розчині амідочорного (кінцева концентрація – 0,0005%). Утворюються буро-сині смуги на блакитному фоні. Фон знебарвлюють багаторазовим промиванням водою.

Варіант 2. Гель витримують при кімнатній температурі 20–30 хвилин у 0,5% розчині солянокислого бензидину в ацетатному буфері pH 4,7. Потім гелі занурюють у 0,1% водний розчин H_2O_2 .

Для зниження дифузії попередньо гель рекомендують обробити 5–15 хвилин розчином 0,1% молібденовокислого амонію.

Варіант 3. Готують 0,2–0,3% розчин бензидину у 96% етанолі та на кожні 100 мл додають 500 мг нітропрусиду натрію, розчиненого у декількох мілілітрах води. Такий вихідний розчин добре зберігається у холодильнику протягом кількох місяців.

Перед використанням змішують однакові об'єми вихідного розчину та 0,06% перекису водню (3% H_2O_2 розводять у 50 разів) та заливають гель сумішшю. Через декілька хвилин форми пероксидази виявляються у вигляді синіх смуг.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: натрій-калій-фосфатний буфер Сьоренсена, pH 7,4–7,5 – 100 мл; пірогалол – 250 мг.

Гель витримують у розчині при кімнатній температурі 20–40 хвилин (у випадку сильного потемніння розчину можна замінити його на свіжий). Обполіскують гель водою та заливають 0,03% водним розчином H_2O_2 . З'являються рудо-бурі смуги.

Варіант 5. Аналогічний попередньому. Замість пірогалолу у якості субстрату ферменту беруть 220 мг пірокатехіну.

Варіант 6. Аналогічний попередньому. У якості субстрату беруть 150 мг *n*-фенілендіаміну.

Варіант 7. Аналогічний попередньому. У якості субстрату беруть 180 мг *N,N*-диметил-*n*-фенілендіаміну.

Для виготовлення натрій-калій-фосфатного буфера Сьоренсена, pH 7,4–7,6 взяти на 1000 мл кінцевого об'єму буферу 9,715 г $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ та 1,650 г KH_2PO_4 . Буфер можна приготувати концентрованим у п'ять разів, але в такому розчині у холодильнику солі легко осаджуватимуть.

Варіант 8. Розчинюють 1 г кислого фуксину (або кислого фіолетового, або патентованого синього) у 100 мл 2% розчину оцтової кислоти, додають 5–10 г цинкового пилу та кип'ятять до знебарвлення суміші або до появи блідо-коричневого кольору. Потім

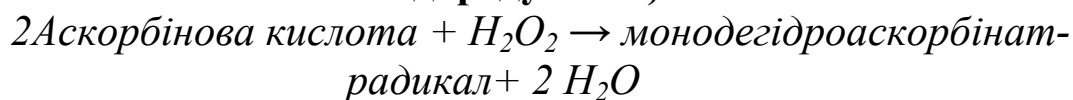
додають 2 мл крижаної оцтової кислоти. Отриманий вихідний розчин зберігають у холодильнику.

Перед фарбуванням змішують 10 мл 3% H_2O_2 і 100 мл вихідного розчину та цією сумішшю заливають гель. Забарвлення з'являється через декілька хвилин.

Вище зазначені прописи придатні для виявлення так званої гваякол-пероксидази (мієлопероксидази крові), що має незначну субстратну специфічність. Існують інші ферменти з пероксидазною активністю, які характеризуються специфічністю до певних субстратів: глутатіон-пероксидаза та аскорбінат-пероксидаза (в англійській літературі – аскорбат-пероксидаза). Для їх виявлення є спеціальні методики.

Аскорбінат-пероксидаза

**(КФ 1.11.1.11 Аскорбінова кислота: пероксид водню–
оксидоредуктаза)**



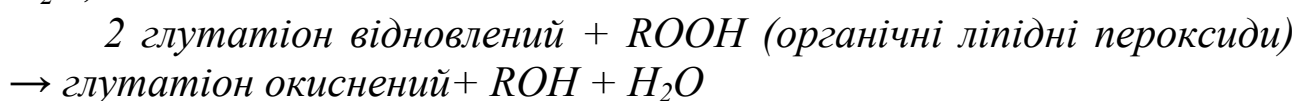
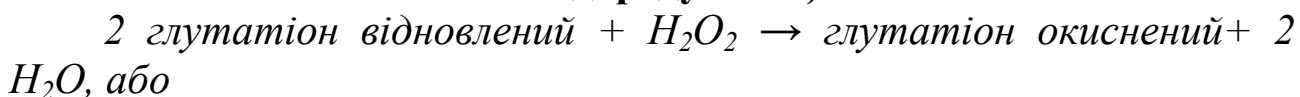
Гель спочатку інкубують 20–30 хв. у розчині 50 мМ натрій (або калій) - фосфатного буфера (pH 7,0), що містить 4 мМ аскорбінової кислоти. Потім гель переносять у такий же буфер, який додатково містить 2 мМ пероксиду водню та інкубують 30 хв.

Забарвлення гелю проводять у буфері наступного складу: 50 мМ натрій-фосфат (pH 7,8), 28 мМ ТЕМЕД, 2,45 мМ НСТ до появи білих смуг на сине-фіолетовому фоні.

Візуалізацію ферменту можна здійснювати у такому буфері: 0,01 М калій-фосфатний буфер, pH 7,8 – 100 мл; НСТ – 15 мг; ФМС – 15 мг; $MgCl_2$ – 20 мг.

Глутатіон-пероксидаза (димер, тетраметр)

**(КФ 1.11.1.9 Глутатіон відновлений: пероксид водню–
оксидоредуктаза)**



Гель інкубують на гойдалці 20 хв. у розчині: 0,05 М Трис-НСІ (pH 7,9), глутатіон відновлений (4 мг/мл) та 2 мМ H_2O_2 .

Забарвлення гелю здійснюють таким же чином, як й у випадку вияву аскорбінат-пероксидази.

**Сукцинатдегідрогеназа (мономер, гетеротример)
(КФ 1.3.99.1 Сукцинат: акцептор–оксидоредуктаза)**

Сукцинат + акцептор → фумарат + відновлений акцептор

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,03 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,3 – 100 мл; НСТ – 50 мг; ФМС – 15 мг; 1 М сукцинат – 6 мл.

Гель інкубують з цією сумішшю 15–30 хвилин у темряві до появи темно-синіх смуг у зонах локалізації ферменту при температурі 30–37 °С.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,5 – 100 мл; НСТ – 40 мг; ФМС – 2,4 мг; *MgCl*₂ – 40 мг; сукцинат натрію – 432 мг.

Інкубують при 37 °С протягом 15–20 хвилин.

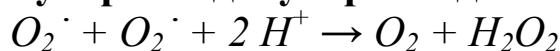
Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 7,4 – 95 мл; телурит калію – 100 мг; 0,1 М *NaCN* – 5 мл; *MgCl*₂ – 40 мг; сукцинат натрію – 500 мг.

Інкубують до появи чорних смуг.

Метод з використанням телуриту менш чутливий, ніж метод зі сполуками тетразолію, однак він дає дуже контрастне забарвлення. Даний варіант фарбування (із застосуванням телуритів) придатний також для виявлення інших дегідрогеназ.

Контроль специфічності здійснюють за допомогою суміші, яка не містить сукцинат. Специфічним інгібітором ферменту є малонат, якого додають у еквівалентному співвідношенні до сукцинату. При цьому повністю пригнічується досліджувана ферментативна активність. Антиміцин *A* також пригноблює окиснення сукцинату. Фермент інгібується також аміталом у кінцевій концентрації останнього 10 мМ, сураміном (антриполлом; байером 205; германином; фурно 309) у концентраціях 0,001–0,01 мМ (1,5–15 мг/л), алоксаном (мезоксалилсечовиною) – 1 мМ (1,5–2 мг/л) .

**Супероксиддисмутаза (Cu-Zn-СОД – димер, Mn-СОД – тетрамер)
(КФ 1. 15.1.1 Супероксид: супероксид–оксидоредуктаза)**



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,01 М калій-фосфатний буфер, *pH* 7,8 – 100 мл; НСТ – 15 мг; ФМС – 15 мг; *MgCl*₂ – 20 мг.

Гель витримують у забарвлюючому буфері 20 хвилин при кімнатній температурі. Буфер зливають, гель опромінують за допомогою будь-якого джерела ультрафіолетового світла. Процедура опромінення триває не більше 1–2 хвилин. Потім гель знову заливають тим же забарвлюючим розчином. Зазначену обробку повторюють декілька разів до формування контрастного забарвлення. Фермент виявляється у вигляді безколоворих смуг на темно-синьому фоні.

Кількість НСТ і ФМС можна збільшити до 20, або 40 мг. Зручно також використовувати концентрований фосфатний буфер, який додається у відповідній кількості.

Фермент інгібується госиполом у кінцевій концентрації 0,25 мМ (130 мг у літрі).

Пропис 0,01 М калій-фосфатного буфера, pH 7,8, сконцентрованого у 10 разів: KH_2PO_4 – 2,72 г; KOH – 1,11 г; вода – до 200 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 50 мМ Трис- HCl буфер, pH 7,6, рибофлавін – 30 мкМ, ТЕМЕД – 28 мМ, НСТ – 245 мкМ.

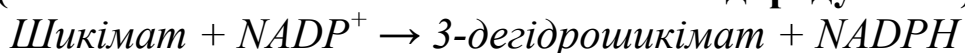
Гель інкубують 20–30 хв. у темряві на гойдалці. Потім гель промивають буфером і витримують на світлі до виникнення безколоворих смуг ферменту на сине-фіолетовому тлі.

Існує декілька форм СОД у залежності від типу перехідного металу-кофактора в активному центрі ферменту: Cu-Zn-СОД, Mn-СОД, Fe-СОД та менш розповсюджена форма Ni-СОД. Зазначені форми СОД мають різну локалізацію у клітинах, різне походження та неоднакову сприятливість до різних інгібуючих речовин. Cu-Zn-СОД виявлена у цитозолі, мітохондріях, пероксисомах, хлоропластах, апопластах еукаріот та у прокаріот. Mn-СОД зустрічається у мітохондріях, пероксисомах та у прокаріот. Fe-СОД виявлена у хлоропластах і прокаріотах. Cu-Zn-СОД пригнічується ціанідами (3–50 мМ), пероксидом водню (5–20 мМ), азид натрію не впливає на активність цієї форми. Mn-СОД інгібується із зазначених сполук тільки азидом (10–30 мМ) і не чутлива до ціанідів та пероксиду. Активність Fe-СОД пригнічується пероксидом і азидом, ціаніди не впливають на цю форму.

Для диференціації різних форм СОД гелі попередньо витримують 20 – 30 хв. у розчині інгібітору, після чого проводять забарвлення.

Шикімаатдегідрогеназа (мономер, димер)

(КФ 1.1.1.25 Шикімаат: NADP-3-оксидоредуктаза)

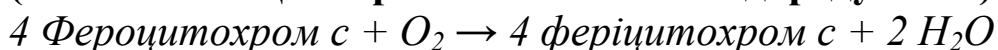


Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,0 – 100 мл; NADP⁺ – 10 мг; НСТ – 25 мг; ФМС – 4 мг; *MgCl*₂ · *H*₂*O* – 40 мг; шикімова кислота – 50 мг.

Умови інкубації: темрява, 30–37 °С.

Цитохромоксидаза. Цитохром *c*₃ (димер, гетеротример)

(КФ 1.9.3.1 Цитохром *c*: кисень-оксидоредуктаза)



Варіант 1 – реакція НАДИ. 136 мг хлоргідрату *N,N*-диметил-*n*-фенілендіаміну розчинюють у 100 мл 0,066 М натрій-калій-фосфатного буферу Сьоренсена, *pH* 5,6–5,9, додають 144 мг α -нафтолу, який попередньо розчинено у 1 мл 50% етанолу.

Сумішню швидко заливають гель та інкубують у темряві при кімнатній температурі (або 37 °С) до появи синіх або синьо-фіолетових смуг. Гель багаторазово промивають водою. Зазначений буфер готують змішуванням розчинів *Na*₂*HPO*₄ × 2 *H*₂*O* (11,876 г у 1 л) і *KH*₂*PO*₄ (9,078 г у 1 л) у пропорції відповідно до порядку перерахування розчинів: *pH* 5,6 – 5:95; *pH* 5,9 – 10:90.

В залежності від активності ферменту діапазон кількості аміну та нафтолу в інкубаційному розчині може коливатися від 20 до 150 мг. Значення *pH* розчину може доводитися до 7,4–7,6. Для перевірки специфічності фарбування застосовують інгібітори: азид натрію (0,005 М), фенілуретан (0,003 М), *KCN* (0,001 М), якими обробляють паралельні проби.

Варіант 2. До 100 мл 0,02 М фосфатного буфера, *pH* 7,4 додають 150 мг цитохрому *c*, 30 мкг каталази, 40 мг α -нафтолу і наприкінці (перед використанням) 80 мг хлоргідрату або оксалату 4-аміно-1-*N,N*-диметилнафтіламіну. Усі компоненти попередньо окремо розчиняють у невеликій кількості розчинника. Формуються смуги фіолетового кольору. Після появи забарвлених смуг гель промивають буфером і водою.

Варіант 3. 20–30 мг *n*-амінодифеніламіну (*N*-феніл-*n*-фенілендіаміну) (вільної основи, а не хлоргідрату) і 20–30 мг іншого аміну, нафтолу або сполуки, яка має активну метиленову групу (нафтол-*AS-L3 G*, анілід 1-окси-2-нафталінкарбонової кислоти, 2-ціаноацетилкумарон, 1-феніл-3-метилпіразолон, *n*-метокси-*n*-

амінодифеніламін, 3-аміно-9-етилкарбазол, 8-аміно-1,2,3,4-тетрагідрокінолін) розчиняють у 0,5 мл етанолу. Замість комбінації двох речовин можна взяти 40–60 мг *n*-амінодифеніламіну, потім додати 70 мл дистильованої води. До отриманого мутного розчину приливають 30 мл 0,2 М Трис-*HCl* буферу, *pH* 7,4. Суміш струшують, фільтрують через папір і заливають гель.

Інкубують у темряві до появи забарвлених смуг.

У присутності 8-аміно-1,2,3,4-тетрагідрокіноліну формується темно-синє забарвлення, інших речовин – червонувато-коричневе.

Забарвлення можна посилити та закріпити. Для цього гель переносять на 1 годину у 10% розчин ацетату кобальту (II) у 10% кислому формаліні (розбавляти формалін 0,2 М ацетатним буфером *pH* 5,2). У якості комплексоутворювача замість зазначеної солі кобальту можна застосовувати хлорид нікелю, нітрат урану або свинцю, сульфат кадмію, залізоамонієвий сульфат.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: 100 мл буфера Сьоренсена, *pH* 7,4–7,6, якій містить 20 мг (до 50) *n*-фенілендіаміну, 20 мг (до 40) хлориду неотетразолію та 4 мг (до 10) цитохрому *c*.

Інкубують у темряві, 37 °С до появи забарвлених смуг ферменту. Як контроль застосовують обробку гелів розчином без *n*-фенілендіаміну або без цитохрому *c*, або без обох компонентів.

У деяких методиках рекомендують попередньо відновлювати цитохром *c*. До 20 мл його розчину додають біля 70 мг гідросульфїту натрію, при цьому виникає рожеве забарвлення. Залишок гідросульфїту видаляють шляхом струшування розчину впродовж 5–10 хвилин. Окремо розчинюють *n*-фенілендіамін і тетразолій. Потім розчини об'єднують і відразу застосовують.

КЛАС 2. ТРАНСФЕРАЗИ

Аспартамінотрансфераза (димер)

(КФ 2.6.1.1 L-Аспартат: 2-оксоглутарат амінотрансфераза)

L-Аспартат + 2-оксоглутарат → оксалоацетат + *L*-глутамат

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,153 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 8,0 – 100 мл; міцний синій ББ сіль – 300 мг; піридоксаль-5-фосфат – 8 мг; *L*-аспарагінова кислота – 340 мг; α-кетоглутарова кислота – 150 мг.

Умови інкубації: темрява, 30–37 °С.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,6 – 75 мл; міцний синій ББ сіль – 200 мг; пірідоксаль-5-фосфат – 5 мг; L-аспарагінова кислота – 230 мг; α-кетоглутарова кислота – 100 мг.

Варіант 3. Розчин А. 0,2 М фосфатний буфер, *pH* 7,4 – 70 мл; бичачий сироватковий альбумін – 50 мг; пірідоксаль-5-фосфат – 1,5 мг; L-аспарагінова кислота – 200 мг; α-кетоглутарова кислота – 50 мг. Розчин Б. Вода – 30 мл; міцний фіолетовий – 120 мг.

Перед використанням розчини об'єднують та заливають сумішню гель.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: вода – 200 мл; міцний гранатовий *GBC* сіль – 3 г; полівінілпіролідон – 2 г; ЕДТА натрієва сіль – 200 мг; NaH_2PO_4 – 6 г; L-аспарагінова кислота – 550 мг; α-кетоглутарова кислота – 150 мг.

Варіант 5. Інкубаційний розчин: 0,2 М фосфатний буфер, *pH* 7,4 – 5,3 мл; 6-бензамідо-4-метокси-мета-толуол-діазоній хлорид – 50 мг; бичачий сироватковий альбумін – 12 мг; полівінілпіролідон – 0,75 г; пірідоксаль-5-фосфат – 0,1 мг; 0,2 М L-аспартат натрію, *pH* 7,4 – 1,7 мл; 0,1 М α-кетоглутарат калію, *pH* 7,4 – 0,7 мл; вода – 1,9 мл.

Сумішню просочують хроматографічний папір № 1 та накривають поверхню гелю. Інкубацію проводять при 37 °С. У місці розміщення ферменту з'являється червоно-рожеве забарвлення.

Глутатіон трансфераза. Глутатіон-S-трансфераза.

Глутатіон-S-арілтрансфераза. Глутатіон-S-алкілтрансфераза.

S-(гідроксиалкіл)глутатіон ліаза (димер)

(КФ 2.5.1.18 RX: глутатіон R-трансфераза)

RX + глутатіон відновлений → HX + R-S-глутатіон

R - аліфатична, ароматична або гетероциклічна група, X – сульфатна, нітрильна або халідна група; фермент також каталізує приєднання аліфатичних епоксидів і аренових оксидів до глутатіону, відновлення глутатіоном поліольних нітратів у поліольні нітрили, деякі реакції ізомеризації і дисульфідного обміну.

Варіант 1. Інкубаційний розчин: глутатіон відновлений – 1 мМ, 1-хлор-2,4-динітробензол – 1 мМ, 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 6,5.

Гелі інкубують 40 хв у вищезазначеному буфері при 37 °С. Потім поміщують у розчин для прояву складу: МТТ – 12 мг, 2,6-діхлорфеноліндофенол – 1 мг, розчиненні у 30 мл 0,1 М Трис-буфері (*pH* 10,1). Витримують 37 °С до появи безкольорових смуг на синьому фоні (до 30 хв).

Варіант 2. Використовується за розділення білків у крохмальному гелі, або у ПААГ з доданням крохмалю. Спочатку гель інкубують у такому ж розчині як у варіанті 1. Для вияву зон ферменту гель занурюють у розчин 5 мМ J_2 і 5 мМ KJ у 0,1 М Трис- HCl буфері (pH 8,0). У місцях розташування ферменту виникають сині смуги на білому фоні.

**Креатинкіназа. Фермент Ломана (димер, октамер)
(КФ 2.7.3.2 АТФ: креатин *N*-фосфотрансфераза)**



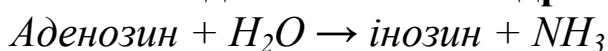
Інкубаційний розчин: 0,5 М Трис- HCl буфер, pH 7,1 – 10 мл; креатинфосфат – 731 мг; АДФ – 75 мг; глюкоза – 90 мг; $MgCl_2 \times 6 H_2O$ – 20 мг; $NADP^+$ – 25 мг; ФМС – 3 мг; НСТ – 20 мг; гексокіназа (дріжджова) – 160 одиниць; глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа – 80 одиниць; вода – 90 мл.

Гель інкубують при 37 °С упродовж 1 години до появи темно-синіх смуг. Крім креатинкінази можуть виявлятися також смуги аденілаткінази. В зв'язку з цим потрібен контроль аденілаткіназної активності. Для цього гель обробляють за тих же умов у тому ж середовищі, але з виключенням із нього креатинфосфату.

Крім креатину акцептором фосфату може слугувати також *N*-етилглікоціамін.

КЛАС 3. ГІДРОЛАЗИ

**Аденозиндезаміназа (мономер)
(КФ 3.5.4.4 Аденозин–аміногідролаза)**



Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-ацетатний буфер, pH 7,5 – 50 мл; дитіотреїтол – 7 мг; НСТ – 35 мг; аденозин – 35 мг.

Гель інкубують при температурі 37 °С до виникнення в місцях локалізації ферменту темно-синього забарвлення.

Потужними інгібіторами являються коформіцин, ковідарабін або пентостатін (кінцева концентрація не більше 0,00002 мкМ).

**α -Амілаза. Птіалін. Діастаза. Глікогеназа (мономер)
(КФ 3.2.1.1 1,4- α -D-Глюкан глюкано-гідролаза)**

Каталізує ендогідроліз 1,4- α -глюкозидних зв'язків у полісахаридах,

що містять три або більше залишків D-глюкози, з'єднаних 1,4- α -зв'язками. Зв'язки у полісахаридних ланцюгах розщеплює без визначеного порядку.

Електрофоретичне розділення здійснюють у 5% ПАА-гелі з доданням розчинного крохмалю до кінцевої концентрації 0,1–0,15%.

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,2 М ацетний буфер, *pH* 5,5–5,6; 0,02 М хлористого кальцію.

Температура інкубації може коливатися від +30 до +50 °С. Тривалість витримування гелю залежить від активності ферменту: від 0,5–1 години до ночі. Потім гель ретельно промивають дистильованою водою і поміщують у розчин для прояву зон ферменту. В якості останнього може бути слабкий розчин йоду в 7% оцтовій кислоті, або розчин, що містить 0,01 М I_2 та 0,014 М KI .

Незабарвлені (прозорі або світло-блакитні) зони на синьому фоні свідчать про наявність амілазної активності.

Концентрація буфера може бути знижена до 0,1 М, або до 0,01 М. Можна перед інкубацією ретельно промити гель охолодженим (0°C) буфером з метою доведення його *pH* до необхідного значення. Надлишок йоду вимивають 7% оцтовою кислотою.

Варіант 2. Гель інкубують у буфері, як у першому варіанті, з доданням *n*-фенілендіаміну до 0,7%. Потім промивають водою та занурюють у 15% розчин метанолу. Витримують годину при температурі 4 °С. Зони ферменту виявляються як прозорі смуги на сірому фоні.

β -Амілаза. Цукроген-амілаза. Глікогеназа **(КФ 3.2.1.2 1,4- α -D-Глюкан мальто-гідролаза)**

Каталізує ендогідроліз 1,4- α -глюкозидних зв'язків у полісахаридах. Послідовно відщеплює залишки β -мальтози у ланцюгах полісахаридів від кінців, що не відновлюють.

Фермент виявляється таким же засобом, як α -амілаза, однак, хлористий кальцій в інкубаційний розчин не додають.

Для диференціювання α - та β -амілаз використовують наступні особливості. Смуги β -амілази мають червонуватий відтінок. α -Амілаза термостабільна (може витримати короткострокове прогрівання до 70 °С), інактивується при *pH* середовища 3,6 протягом 10 хвилин. β -Амілаза, навпаки, чутлива до підвищеної температури, але не втрачає активності при *pH* 3,6. α -Амілаза активується та

стабілізується іонами кальцію, стійка до незначної кількості іонів ртуті, міді та срібла. β -Амілаза, навпаки, не активується іонами Ca^{2+} і навіть знижує стабільність; дуже чутлива до слідових концентрацій важких металів.

***Амінопептидаза цитозолу. Лейцинамінопептидаза
(мономер)***

(КФ 3.4.11.1 α -Аміноацилпептид-гідролаза цитозолу)

Аміноацилпептид + H₂O → амінокислота + пептид

Раніше класифіковано як КФ 3.4.1.1. Фермент з широкою субстратною специфічністю, гідролізує більшість *L*-пептидів з відщепленням *N*-кінцевого залишку з вільною аміногрупою.

Амінопептидаза мікросомальна

(КФ 3.4.11.2 α -Аміноацилпептид-гідролаза мікросомальна)

Аміноацилпептид + H₂O → амінокислота + олігопептид

Раніше класифіковано як КФ 3.4.1.2. Фермент з широкою субстратною специфічністю, відщеплює від пептидів, амідів та *n*-нітроанлідів α -амінокислоти (переважно аланін), але не пролін

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,1 – 80 мл; міцний гранатовий GBC – 60 мг; 1% розчин *L*-лейцин- β -нафтиламід (або *L*-аланін- β -нафтиламід) – 2 мл.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 6,4 – 100 мл; чорний *K* сіль – 60 мг; *L*-лейцин- β -нафтиламід (або *L*-аланін- β -нафтиламід) – 40 мг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: дистильована вода – 75 мл; 0,05 М розчин феріціаніду калію (червона кров'яна сіль) – 6 мл; аланінове похідне 3-аміно-9-етилкарбазолу – 15 мг.

Субстрати попередньо розчиняють у невеликому (0,5–1 мл) об'ємі спирту, диметилформаміді або ацетону.

Гель інкубують при температурі 37 °С до появи забарвлених смуг у місцях локалізації ферменту.

Амінопептидази активуються іонами магнію та марганцю (5 мМ). Ціанід у концентрації 0,1–0,3 мМ активує ферменти, через збільшення його концентрації (з 10 мМ) спостерігається пригноблення активності. Іони Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} практично повністю пригнічують активність у концентрації в середовищі 1 мМ. В зв'язку з цим, рекомендовано додавати у середовище ЕДТА.

Амінопептидази діють не тільки на пептидні, але й на ефірні зв'язки, тобто проявляють естеразну активність, однак, фторид натрію (2 мМ) та дізопропилфторфосфат (0,5 мМ) не впливають на них.

Карбоксипептидаза *B* конкурентно інгібується δ -гуанідилвалеріановою (160 мг у літрі), δ -аміновалеріановою, ϵ -амінокапроною кислотами у кінцевих концентраціях 1 мМ.

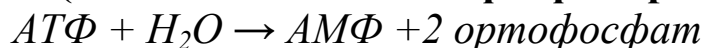
Зазначені вище способи можуть бути застосовані для визначення на електрофореграмах інших пептидгідролаз. Для цього необхідні відповідні специфічні субстрати.

АТФази:

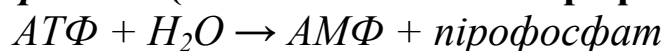
міозин; магній залежна; (КФ 3.6.1.3 АТФ-фосфогідролази);



аніраза (КФ 3.6.1.5 АТФ-дифосфогідролаза);



АТФ-пірофосфатаза (КФ 3.6.1.8 АТФ-пірофосфогідролаза)



Варіант 1 – для кальцій-залежних АТФаз. Гель витримують 3 (від 0,5 до 5) години при 37 °С у розчині: 0,05 М Трис-ацетатний буфер, рН 7,5 – 100 мл; хлористий кальцій – 0,5 (до 1) г; цистеїн – 10 мг; АТФ – 150 мг.

В залежності від завдань дослідження та з метою виявлення різних форм цих АТФаз можна використовувати різні буферні системи із значенням рН від 5,7–6,0 до 8,5–9,4.

По закінченні інкубації розчин з субстратом зливають і гель багаторазово промивають водою (3–5 змін по 10–20 хвилин кожна). Промивку, особливо після інкубації у слабкокислому середовищі, ліпше здійснювати за допомогою 1% розчину хлористого кальцію (з рН розчину біля 8). Можна використовувати для промивки також розчин $CaCl_2$ у 75% етанолі.

Потім гель обробляють 5–20 хвилин у 2% розчині хлориду (цитрату, ацетату) кобальту. Далі гель багаторазово промивають водою і занурюють на 2 хвилини у розчин 1% Na_2S або сульфід амонію. Гель промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді чорних смуг.

Вияв осаду фосфату кальцію можна здійснити іншим засобом. Гель переносять у 1% розчин $AgNO_3$ та витримують під дією денного світла 1 годину. Промивають дистильованою водою та обробляють

5% розчином $Na_2S_2O_3$ упродовж 10 хвилин. Знову промивають водою. Зони ферменту забарвлюються у колір від жовто-коричневого до чорного.

Міозин та апіраза стимулюються іонами кальцію та пригнічуються іонами магнію. Для деяких типів АТФаз кофактором являються іони магнію, тоді у середовище вводять його сіль (до кінцевої концентрації 1 мг/мл).

Існують форми АТФаз, для оптимального прояву активності яких потрібна присутність у середовищі як іонів кальцію, так й іонів магнію.

Варіант 2. Мітохондріальна АТФаза інгібується іонами кальцію і активується магнієм. Для її вияву рекомендують замість хлористого кальцію використати розчинну сіль свинцю. Через те, що свинець пригнічує активність цих АТФаз, його концентрація у середовищі має бути не більше 2,5–3 мМ.

Гель інкубують від 10 хвилин до 3 годин при кімнатній температурі або при 37 °С у середовищі складу: 0,08 М Трис-малеатний буфер, рН 7,2 – 50 мл; АТФ – 26 мг; $MgSO_4$ – 123 мг; $Pb(NO_3)_2$ – 40 мг. Компоненти розчиняти у порядку їх наведення у пропису.

Потім гель промивають дистильованою водою, обробляють 1–2 хвилини у розчині 1% Na_2S або сульфїду амонію. Гель промивають дистильованою водою до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді чорних смуг.

Інгібуючу дію свинцю можна знизити за допомогою комплексоутворювача тирону (бренкатехін-3,5-дисульффонату). Також при виявленні АТФаз рекомендують використовувати замість свинцевої солі водорозчинну сполуку стронцію, якій не має інактивууючого ефекту.

Для встановлення специфічності прояву АТФаз провадять наступні контрольні фарбування:

- 1) у розчині без субстрату;
- 2) без хлориду кальцію або солі свинцю для виявлення спонтанного неферментного гідролїзу;
- 3) у розчині з β -гліцерофосфатом, або *n*-нітрофенїлфосфатом, інозіндифосфатом (чи іншими дифосфатами) замість АТФ в якості субстрату;
- 4) з *n*-хлормеркурїбензоатом у концентрації 2,5 мМ.

Активність деяких особливих форм залежить від присутності Na^+ та K^+ і інгібується оубаїном (строфантином *G*), якій не діє на інші АТФази. Для виявлення цих АТФаз в якості активатора використовують іони калію, а як субстрат можна брати *n*-нітрофенілфосфат. В інкубаційний розчин вводять сіль стронцію.

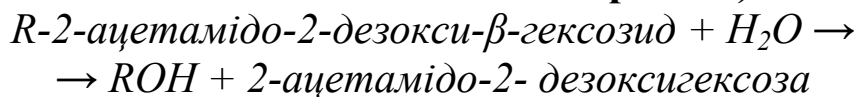
Інгібітором мембранозв'язаних АТФаз є *N,N'*-дициклогексилкарбодіімід (ДЦКД, *DCCD*).

Ацетилхолінестераза (тетраметр)

Див. рубрику щодо прояву ферментів групи естераз (КФ 3.1.1.-)

***β-N*-Ацетилгексозамінідаза (димер)**

(КФ 3.2.1.52 2-Ацетамідо-2-дезоксид-*β*-гексозид-ацетамідодезоксигексогідролаза)



Проводять двобічний (див. розділ 3.5) електрофорез у 1% агарозі у 0,04 М фосфатно-цитратному буфері, *pH* 6,0.

Варіант 1. Інкубаційний розчин. Насичений (0 °С) розчин *β*-(*α*-нафтил)-*N*-ацетил-*D*-глюкозамініду у 0,1 М цитратному буфері, *pH* 5,5 – 50 мл; міцний гранатовий *GBC* – 65 мг.

Замість зазначеного субстрату можна застосовувати також *β*-(*n*-нітрофеніл)-*N*-ацетил-*D*-глюкозамінід, глюкозид нафтолу *AS-LC*; замість *GBC* – міцний синій *B*, міцні червоні *TR* та *RC*.

Гель інкубують при кімнатній температурі до появи забарвлених смуг у зонах локалізації ферменту.

Варіант 2. Інкубаційний розчин. 1 М розчин 4-метилумбеліферіл-*β-N-D*-ацетилглюкозамініду у 0,1 М фосфатно-цитратному буфері, *pH* 4,4.

Гель витримують в інкубаційному розчині при 37 °С протягом 1 години. Далі розчин зливають, гель обережно обприскують 1 М гліцин-карбонатним буфером, *pH* 11,0. Пластини гелю аналізують під джерелом ультрафіолетового світла ($\lambda = 366$ нм).

Форми ферменту проявляються у виді смуг, що флуоресціюють на темному фоні гелю.

Активність ферменту знижується у ацетатному буфері. Інгібітором *β-N*-ацетилгексозамінідази є *N*-ацетил-глюкозамінолактон у кінцевій концентрації 0,1 мМ.

α-Глюкозидаза. Мальтаза. Глюкоінвертаза. Глюкозидосахараза
(мономер, тетрамер)

(КФ 3.2.1.20 α-D-Глюкозид–глюкогідролаза)

Гідролізує 1,4-зв'язки кінцевого, що не відновлює, залишку α-D-глюкози; вивільняється α-глюкоза.

Група ферментів, що швидко гідролізують олігосахариди, і повільно, або зовсім не гідролізують полісахариди.

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,025 М фосфатний буфер, рН 6,5 – 100 мл; 6-бром-2-нафтил-α-D-глюкопіранозид – 15–50 мг. Субстрат попередньо розчиняють в етанолі, або ацетоні. До інкубаційного розчину можна додати 1 г полівінілпіролідону.

Температура інкубації – 37 °С, тривалість – 1–2 години.

Потім гель обполіскують холодною водою та занурюють на 2 хвилини у холодний розчин (1мг/мл) міцного синього В у фосфатному буфері, рН 7,5.

Фермент виявляється у вигляді синіх смуг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,4 М фосфатний буфер, рН 6,0 – 80 мл; ФМС – 12 мг; НСТ – 32 мг; глюкозооксидаза – 16 мг; мальтоза – 40 мг. Мальтоза не повинна мати домішку глюкози.

Гель інкубують за температури 37 °С до появи смуг синього кольору в місцях локалізації ферменту. Реакцію фарбування можна зупинити обробкою 10% ТХО.

Іони срібла, міді, ртуті, а також окиснювачі інгібують фермент; формальдегід також швидко інактивує глюкозидазу.

β-Глюкозидаза. Генціобіаза. Целобіаза. Амігдалаза
(мономер, димер)

(КФ 3.2.1.21 β-D-Глюкозид–глюкогідролаза)

Гідролітично відщеплює кінцеві, що не відновлюють, залишки β-D-глюкози; вивільняється β-глюкоза.

Мають широку специфічність щодо гідролізу β-D-глюкозидів; деякі ферменти гідролізують β-D-галактозиди, β-D-арабінозиди, β-D-ксілозиди

Варіант 1. Так же, як при візуалізації α-глюкозидази, але з іншим субстратом. Субстрат – 6-бром-2-нафтил-β-D-глюкопіранозид. Можна застосовувати більш кислі середовища з рН 4,9–5,0.

Варіант 2. Так же, як при візуалізації α-глюкозидази, але з іншим субстратом, а саме – целобіозою, генціобіозою, або амігдалозою.

Можна застосовувати більш кислі середовища з pH 4,9–5,0.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,2 М ацетатний буфер, pH 5,0–5,4 – 75 мл; полівінілпіролідон (молекулярна маса 11 000) – 500 мг; β -(5-броміндаліл-3)-*D*-глюкопіранозид – 20 мг (розчинити у 1 мл диметилформаміду).

Інкубують до появи забарвлених смуг ферменту.

Глюкоамілаза. γ -Амілаза. Кисла мальтаза. Екзо- α -глюкозидаза
(КФ 3.2.1.3 1,4- α -D-Глюкан–глюкогідролаза)

Каталізує послідовне відщеплення кінцевих залишків α -D-глюкози, які з'єднані 1,4-зв'язками, від кінців ланцюгів, що не відновлюють; вивільнюється β -глюкоза

Інкубаційний розчин: 0,4 М фосфатний буфер, pH 6,0 – 80 мл; ФМС – 12 мг; НСТ – 32 мг; глюкозооксидаза – 16 мг; амілопектин – 1,6 г.

Гель інкубують при 37 °С до появи смуг ферменту синього кольору. Реакцію фарбування можна зупинити обробкою 10% ТХО.

Глюкозо-6-фосфатаза (мономер, димер)
(КФ 3.1.3.9 D-Глюкозо-6-фосфат–фосфогідролаза)

D-Глюкозо-6-фосфат + H₂O → D-глюкоза + ортофосфат

Можливо, цей фермент ідентичний ферментам фосфорамідат:гексоза-1-фосфотрансферазі (КФ 2.7.1.62), пірофосфат:гліцерол-1-фосфотрансферазі (КФ 2.7.1.79), які каталізують зворотний процес – перенос фосфату на вуглевод, а також, можливо, ідентичний іншій фосфатазі – неорганічній пірофосфатазі (КФ 3.6.1.1)

Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-малеатний буфер, pH 6,7 – 20 мл; 0,125% розчин калієвої солі глюкозо-6-фосфату – 20 мл; 2% розчин нітрату свинцю – 7 мл; дистильована вода – 7 мл. Замість калієвої солі можна застосовувати динатрієву соль глюкозо-6-фосфату.

Гель інкубують при 32–37 °С від 5 до 30 хвилин. Потім промивають у декількох порціях дистильованої води і обробляють 5 хвилин у розчині 1% Na₂S або сульфїду амонію. Гель промивають дистильованою водою до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді чорних смуг.

Оптимум активності ферменту знаходиться у зоні pH біля 6,0–6,7, в ізольованому стані він найбільш активний за pH 8. У

останньому випадку можна застосовувати хлористий кальцій замість солі свинцю.

Фермент на відміну від «неспецифічних» фосфатаз дуже чутливий до кислого середовища та підвищеної температури: у розчині з pH 5 він денатурує та швидко інактивується при нагріванні. Блокада SH -груп веде до пригнічення активності ферменту, тоді як активність «неспецифічних» лужних та кислих фосфатаз залишається без змін. Іони арсенату та фториду інгібують глюкозо-6-фосфатазу, як і лужні фосфатази. Крім того, його активність пригнічується іонами цинку, ціаніду, а також алоксаном. Глюкоза та подібні сполуки пригноблюють гідролітичну активність ферменту. Специфічним інгібітором глюкозо-6-фосфатази є 1,5-сорбітан-6-фосфат. Глюкозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат помітно не дефосфорилуються.

ДНКазы. ДНКазы I та ДНКазы II

(КФ 3.1.4.5 Дезоксирибонуклеат-5′–нуклеотидогідролаза та

КФ 3.1.4.6 Дезоксирибонуклеат-3′–нуклеотидогідролаза)

ДНК + (n - 1)H₂O → n олигодезоксирибонуклеотидів

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,05 М ацетатний буфер, pH 5,0 – 100 мл; чорний K сіль – 100 мг; кисла фосфатаза – 10 мг; ДНК тимусу (або іншого походження) – 250 мг.

Інкубують при 37 °С до появи синього забарвлення смуг ферменту.

Для ферментів, що мають оптимум активності у лужній зоні, застосовують відповідні буферні розчини та екзогенну лужну фосфатазу.

У відсутності екзогенних фосфатаз можуть виявлятися ферменти типу дезоксирибонуклеотид-3′-фосфогідролаз (КФ 3.1.3.34), які відщеплюють ортофосфати від ДНК та олигодезоксирибонуклеотидів.

Катіони міді, кальцію, марганцю сильно пригнічують активність ферменту, тому під час виготовлення розчинів бажано використовувати бидистильовану (деіонізовану) воду або/і ввести до їх складу ЕДТА.

Варіант 2. Готування плівки із ДНК з желатином. Готують 5 % розчин желатину, нагріваючи на водяній бані. Додають однаковий об'єм 10% розчину ДНК (наприклад, тимусної). Температура желатину перед змішуванням з нуклеїновою кислотою не повинна

перевищувати 40–50 °С. Теплу суміш наносять на скляну пластинку і швидко розмазують по поверхні за допомогою кінчика піпетки. Розміри скла повинні декілька перевищувати розміри гелю. Скло ставлять вертикально, видаляють залишок розчину фільтрувальним папером. Пластинку з желатиновим шаром сушать при кімнатній температурі (20–23 °С) у вертикальному положенні. Після висушування плівки фіксують протягом ночі у 50% нейтральному формаліні при кімнатній температурі, три рази (по 5 хвилин) промивають дистильованою водою та висушують.

Інкубація гелів. Після проведення електрофорезу з гелю знімають одне скло, залишаючи його на другій скляній пластинці. Гель обережно (щоб не сповзав) промивають відповідним буфером, обережно видаляють надлишок рідини. До гелю кладуть желатинову плівку на склі, спостерігаючи за тим, щоб між гелем та желатином не було пухирців повітря, зверху кладуть невеликий вантаж. Для попередження підсихання гелю пластинки загортають у поліетилен. Інкубацію провадять при кімнатній температурі від 5 хвилин до 1 години, після чого пластинки роз'єднують лезом ножа. Плівку желатину фарбують на присутність нуклеїнової кислоти. У присутності ДНКазної активності спостерігаються безкольорові смуги на забарвленому фоні.

Фарбування на присутність нуклеїнових кислот. Усі процедури виконують при кімнатній температурі.

1) Желатинову плівку фарбують 5 хвилин у 0,2% розчині толуїдинового синього, промивають дистильованою водою два рази по 5 хвилин та висушують. РНК та ДНК забарвлюються в синій колір.

2) Желатинову плівку витримують 6 хвилин у розчині метилового зеленого – піронину, швидко обполіскують дистильованою водою. Для отримання розчину барвника готують окремо 2% водні розчини піронину Y та метилового зеленого. Дані розчини екстрагують хлороформом у розділювальній лійці, поки шар хлороформу не стане безбарвним. Перед застосуванням готують суміш з 12,5 мл піронину, 7,5 мл метилового зеленого та 30 мл дистильованої води. РНК забарвлюється у червоний колір, ДНК – у блакитнувато-зелений.

3) Плівку поміщують на 24–48 годин у розчин галоціанін – хромові квасци, промивають дистильованою водою. Готування барвника: 150 мг галоціаніну кип'ятять у 10 мл 5% розчину хромових квасців, охолоджують, фільтрують та доводять об'єм до

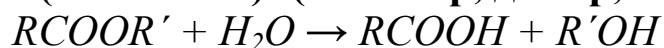
100 мл. Розчин барвника повинен мати pH 1,64, для чого використовують 1 М HCl . Нуклеїнові кислоти набувають темно-синього або чорного кольору.

Для ферментів типу ДНКазі I (КФ 3.1.4.5) оптимальним є нейтральне або слабколужне середовище (pH до 7,3–7,6). Їх активність стимулюється катіонами магнію (кінцева концентрація – 0,015 М). ДНКазі I крові відрізняється від класичної панкреатичної ДНКазі I високою термостабільністю.

Ферменти типу ДНКазі II (КФ 3.1.4.6) мають оптимум pH у кислій зоні (4,8–5,2). Ці нуклеази інгібуються високими концентраціями катіонів металів; максимальне допустима кількість Mg^{2+} – 0,001 М, оптимальне pH – 4,8, оптимальна іонна сила середовища – 0,1 М.

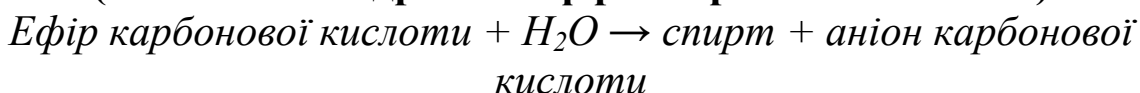
В еритроцитах жаби також знайдені ДНКазі I (оптимальне pH – 7; потрібен магній) і ДНКазі II (оптимальне pH – 5; кількість магнію у середовищі не більше 0,01 М). Однак, ці ферменти є інгібованими у тварин: для їх виявлення жаби повинні перенести голод. З метою вивільнення активних ферментів також можна обробити клітини крові Тритоном X-100 або витримати їх при $-20\text{ }^{\circ}C$.

Естерази (КФ 3.1.1.-): (мономер, димер, тетрамер)



Карбоксилестераза. Арилестераза. Естераза В

(КФ 3.1.1.1 Гідролаза ефірів карбонових кислот)



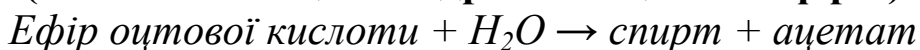
Арилестераза. Ароместераза. Естераза А

(КФ 3.1.1.2 Гідролаза арил-ефірів)



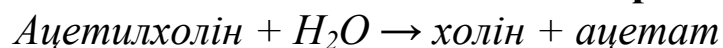
Ацетилестераза. Естераза С

(КФ 3.1.1.6 Ацетилгідролаза оцтових ефірів)



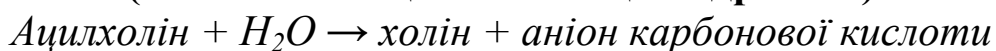
Ацетилхолінестераза. Істинна холінестераза. Холінестераза I

(КФ 3.1.1.7 Ацетилхолін–ацетилгідролаза);



Холінестераза. Псевдохолінестераза. Холінестераза II

(КФ 3.1.1.8 Ацилхолін–ацилгідролаза)



Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,05 М фосфатний буфер, pH 7,0 – 100 мл; міцний синій *RR* сіль – 50 мг; α -нафтилацетат натрієва сіль – 10 мг; β -нафтилацетат натрієва сіль – 20 мг; α -нафтилпропіонат натрієва сіль – 10 мг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, pH 6,0 – 100 мл; міцний синій *RR* сіль – 100 мг; α -нафтилацетат натрієва сіль – 40 мг; β -нафтилацетат натрієва сіль – 40 мг.

Субстрати (нафтоли) і сіль діазонію розчиняють у 2 мл ацетону, потім додають буфер та одразу заливають цією сумішшю гель. Інкубують при кімнатній температурі або при 30–37 °С. Тривалість інкубації у разі низької активності ферменту може складати 6–10 годин. Гелі фіксують 20 хвилин у 3–5% розчині оцтової кислоти, потім промивають водою.

Ізоформи естераз, які мають підвищену специфічність до α -ізомерів нафтолу забарвлюються у темно-коричневий колір, до β -ізомерів – у червоний.

Для запобігання неспецифічного фарбування фону гелю до 100 мл реакційного розчину рекомендують додавати 2–5 мл 4% формаліну.

Замість міцного синього *RR* можна застосовувати міцний синій *B*, міцний гранатовий *GBC*.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,2 М фосфатний буфер, pH 8,0 – 100 мл; міцний синій *RR* сіль – від 200 до 500 мг; 15% розчин у ацетоні натрієвої солі α -нафтилацетату – 5 мл. Сіль діазонію добавляють у розчин безпосередньо перед застосуванням. Суміш ретельно перемішують та фільтрують.

Виявлення ферментів триває 10–30 хвилин при 20 °С. Смуги естераз забарвлюються у чорний колір. Електрофореграми можна зберігати у 20% етанолі.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-*HCl* буфер, pH 7,0 – 100 мл; індоксилацетат – 60 мг (попередньо розчинюють у декількох краплях ацетону).

Гелі витримують у забарвлюючому розчині 30 хвилин, 37 °С. Зони естераз забарвлюються у блакитний колір. Гелі можна зберігати у воді, яку трохи підкислюють оцтовою кислотою. Даний варіант

призначено для естераз, які добре гідролізують ефіри оцтової кислоти.

Варіант 5. Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-*HCl* буфер, *pH* 7,0 – 20 мл; 0,05 М розчин феріціаніду калію – 10 мл; 0,05 М розчин фероціаніду калію – 10 мл; 0,1 М розчин хлориду кальцію – 10 мл; *O*-ацетил-5-броміндоксил – 2 мг; вода – до 100 мл. Застосовують тільки свіжовиготовлений розчин. Замість зазначеного субстрату можна також використати *O*-ацетил-4-хлор-5-броміндоксил, або *O*-ацетил-5-бром-6-хлоріндоксил. Субстрати розчинюють у 0,1 мл етанолу.

Інкубують при кімнатній температурі або при 37 °С від 1 хвилини до 15 годин до появи смуг синього кольору.

Диференціювати різні естерази дуже важко. По-перше, вони мають субстратну специфічність, яка дуже перекривається. По-друге, специфічність, кінетичні параметри ферментів та чутливість до різних інгібіторів залежить не тільки від виду тварин, але й від того, з якого органа чи тканини отримано фермент. Для більш-менш визначеного розрізнення досліджуваних ферментів застосовують різні субстрати та аналізують ефекти різноманітних інгібіторів та активаторів.

Карбоксилестерази (КФ 3.1.1.1) здатні гідролізувати ефіри вітаміну А. Карбоксилестерази розщеплюють ацетати швидше за бутирати і, в цілому, віддають перевагу ефірам алифатичних та нижчих ароматичних жирних кислот.

Арилестерази (КФ 3.1.1.2) гідролізують ефіри ароматичних жирних кислот; вони розщеплюють бутирати з такою ж швидкістю і навіть швидше, ніж ацетати. Арилестераза із сироватки барана гідролізує також параоксон.

Естераза С (КФ 3.1.1.6) з найбільшою швидкістю гідролізує ефіри оцтової кислоти.

Холінестерази гідролізують переважно (но не виключно) ефіри холіну. Однак, ацетилхолінестераза (КФ 3.1.1.7) інгібується високими концентраціями ацетилхоліну, холінестераза (КФ 3.1.1.8) – ні. Ацетилхолінестераза має значно більшу спорідненість до ацетатних ефірів холіну та його похідних. Холінестераза гідролізує з рівною швидкістю будь-які ефіри холіну (пропіонові, бутирилові і т. і.).

Холінестерази та ацетилхолінестерази мають високу чутливість до езерину, прозерину (простигміну, або неостигмінброміду у концентрації 0,1–0,01 мкМ). Фосфорорганічні сполуки інгібують їх у

дуже низьких концентраціях – до 0,01 мкМ. Тетраетилпірофосфат (0,01–0,001 мкМ, тобто від 3 до 30 мкг/л) інгібує холінестерази з мозку та плазми крові.

Карбоксилестерази (КФ 3.1.1.1) пригнічуються діетил-*n*-нітрофенілфосфатом (Е 600) у концентрації 0,01 мкМ; вони дуже чутливі також до діізопропилфторфосфату. По відношенню до фториду карбоксилестерази діляться на резистентні (панкреатичний тип), та чутливі до *NaF* (печінковий тип). *NaF*-резистентні форми мало чутливі також до діізопропилфторфосфату.

Карбоксилестерази активуються амінокислотами (аргінін, лізин, гістидин, цистеїн).

Арилестерази (КФ 3.1.1.2) не пригнічуються діетил-*n*-нітрофенілфосфатом у концентрації до 0,01 – 1 мМ; вони стійкі також до діізопропилфторфосфату. Деякі не тільки мають резистентність до фосфорорганічних сполук, а навіть їх гідролізують. Їх інгібують іони металів (Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), йодацетат, жовчні солі (таурохолат), фтор. Арилестерази блокуються комплексоутворюючими сполуками та активуються іонами кальцію. Арилестерази, як і карбоксилестерази, активуються цистеїном у концентрації 1 мМ.

Ацетилестерази (КФ 3.1.1.6) стійкі до фосфорорганічних сполук, але не здатні їх розщеплювати; вони інгібуються іонами металів (Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}). Ацетилестерази активуються *n*-хлормеркурібензоатом у концентрації 0,01–0,1 мМ, тоді як естеразу А даний реагент пригнічує.

Ацетилхолінестераза та Холінестераза

Біохімічну характеристику див. вище під рубрикою „Естерази”

Варіант 1. Розчин для фарбування. Субстрат – ацетилтіохолін-йодид 200 мг, або бутирилтіохолін-йодид 200 мг – розчиняють у 100 мл розчину наступного складу: $CuSO_4 \times 5 H_2O$ – 150 мг; $MgCl_2 \times 6 H_2O$ – 510 мг; Na_2SO_4 – 34,1 г; буфер для фарбування – 100 мл. Перший субстрат більш специфічний до ацетилхолінестераз, другий – до холінестераз.

Буфер для фарбування: гліцин – 1,65 г (0,022 М); малеїнова кислота – 8,71 г (0,075 М); 1 М *NaOH* – 15 мл; вода – до 1000 мл; *pH* 6,0.

Гель інкубують у вищенаведеному розчині для фарбування 1 годину при 37 °С. Після цього його промивають у 100 мл 40%

розчину (насиченого за нагрівання) Na_2SO_4 . Потім гель заливають 100 мл розчину 0,01 М $(NH_4)_2S$. У зонах локалізації ферментів виникає темно-коричневе забарвлення.

Для того, щоб розрізнити між собою зазначені естерази застосовують специфічні інгібітори, які додають у розчин для фарбування. Ацетилхолінестеразу інгібує 1,5-біс-(4-триметилфеніламоній)-пентан-3-он-дійодид; до 100 мл додають 1 мл розчину (0,05 мг/мл) цього інгібітору. Холінестераза специфічно пригнічується тетраізопропилпірофосфорамідом; до 100 мл додають 0,5 мл розчину (0,5 мг/мл) цього інгібітору.

Іноді насичений розчин сульфату натрію замінюють 7,5% розчином полівінілпіролідону.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,1 М натрій-малеатний буфер, pH 6,0 – 65 мл; ацетилтіохолін-йодид (або бутірилтіохолін-йодид) – 50 мг, 0,1 М розчин цитрату натрію – 5 мл; 30 мМ розчин сульфату міді – 10 мл; 5 мМ розчин фериціаніду калію – 10 мл; вода – 10 мл. Інгредієнти розчинюють у порядку їх перелічення. Необхідно застосовувати дистильовану воду, яку перегнано у скляному посуду.

Гель інкубують 15–120 хвилин за температурою біля $0^\circ C$ (крижана баня), потім промивають холодною водою. Ферменти маркуються смугами коричневого кольору. Застосування інгібіторів для диференціювання ацетилхолінестерази і холінестерази як у варіанті 1.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: у 83 мл 0,1 М Na_2HPO_4 розчинюють тіолоцтову кислоту до 0,12 М, нітрат свинцю до 1 мМ, потім додають 17 мл фосфатно-цитратного буферу Мак-Ільвейна, pH 6,2.

Інкубують при кімнатній температурі 0,5–1 годину, п'ять хвилин промивають гель холодною ($4^\circ C$) водою. Холінестеразна активність виявляється у вигляді чорного осаду сульфідів свинцю.

Ацетилхолінестераза з еритроцитів має молекулярну масу 230–350 тисяч, складена з чотирьох субодиниць з приблизно однаковою молекулярною масою; оптимум каталітичної активності при pH 7,5–8,5.

Ліпаза. Триацилгліцерол-ліпаза (гетеродимер)
(КФ 3.1.1.3 Триацилгліцерол–ацилгідролаза)
*Триацилгліцерол + H₂O → диацилгліцерол + аніон
жирної кислоти*

Основний розчин. Готують 5% розчин «Твину-60», або «Твину-80» у 0,1 М Трис-*HCl* буфері, *pH* 7,0–7,4. Додають хлористий кальцій до 0,5% і декілька кристаликів камфари, або тимолу. Суміш витримують 1–2 доби при 37 °С, потім фільтрують через скляний або асбестовий фільтр Зейцу.

Інкубаційний розчин. До 1 мл основного розчину додають 44 мл 0,05 М Трис-*HCl* буферу, *pH* 7,0–7,4 та 3 мл 2% розчину *CaCl*₂ та декілька кристаликів камфари.

Гелі інкубують при 37 °С від 3 до 24 годин, ретельно промивають дистильованою водою. Потім гель обробляють 1–2% розчином нітрату свинцю 10–15 хвилин при температурі 55–60 °С. Знову промивають декількома порціями дистильованої води по 10 хвилин у кожній. Потім гель занурюють на 2–5 хвилини у розчин 1% *Na*₂*S* або сульфиду амонію. Гель промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді коричнево-чорних смуг.

Для візуалізації зон ферменту замість обробки свинцевою сіллю можна застосовувати колоїдний розчин нильського блакитного. Розчин барвника готують наступним чином: 20 мг нильського блакитного розчиняють у 20 мл етанолу, розчин фільтрують і по краплям додають до 200 мл 2,5% гарячого розчину гуміарабіку. Розчин випаровують до об'єму 100 мл.

Гель після інкубації обробляють у вищезазначеному розчині нильського блакитного. Зони ферментів маркуються смугами блакитного кольору.

Інші естерази також можуть розщеплювати різні «Твини». Для їх диференціювання можна вводити у інкубаційний розчин таурохолат. З одного боку він активує ліпази, з другого – пригнічує активність інших естераз. Активність ліпаз інгібується хініном.

Нуклеозидтрифосфатаза. Тіамінпірофосфатаза (димер)
(КФ 3.6.1.15 Неспецифічна дифосфат–фосфогідролаза)

Нуклеозидтрифосфат + H₂O → нуклеозиддифосфат + ортофосфат

Гідролізує будь-які нуклеозидтрифосфати, нуклеозиддифосфати, тіаміндифосфат та ФАД.

Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-малеатний буфер, pH 7,2 – 30 мл; дистильована вода – 6 мл; 0,025 М розчин $MnCl_2$ – 15 мл; 1% розчин нітрату свинцю – 9 мл; 0,01 М розчин тіамінпірофосфату – 15 мл. Деякі автори хлорид марганцю замінюють на хлорид магнію. Інгібуючу дію свинцю можна знизити за допомогою комплексоутворювача тирону (бренкатехін-3,5-дисульфону).

Гель інкубують 1 годину при 37 °С. Рекомендують періодично струшувати гель під час інкубації. Після інкубації гель обполіскують спочатку у дистильованій воді, потім швидко (декілька секунд, не більш 30) у 2% оцтовій кислоті, потім знову промивають дистильованою водою. Гель обробляють 2 хвилини у 1% розчині сульфиду амонію або натрію, після чого промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді коричнево-чорних смуг.

Під час виявлення ферментативної активності pH середовища може коливатися від 5,0 (ацетатний буфер) до 9,5 (вероналовий буфер). Розчин субстрату додають безпосередньо перед інкубацією.

У лужних розчинах замість солі свинцю використовують хлористий кальцій (від 0,015 до 0,1 М у розчині). У такому разі після інкубації гелю процедура обробки наступна. Гель промивають водою і занурюють на 10 хвилин у 2% розчин будь-якої розчинної солі кобальту. Гель знову промивають водою та обробляють 5 хвилин у 1% розчині сульфиду амонію або натрію. Гель промивають до знебарвлення фону.

Для пригнічення активності «неспецифічної» лужної фосфатази до інкубаційного середовища додають хлоргідрат цистеїну (до кінцевої концентрації 0,004 М).

5'-Нуклеотидаза (мономер, димер, гетеродимер, тетрамер)

(КФ 3.1.3.5 5'-Рибонуклеотид-фосфогідролаза)

5'-Рибонуклеотид + H₂O → рибонуклеозид + ортофосфат

Варіант 1. Гель інкубують 3 (від 2 до 5) години при 37 °С у середовищі наступного складу: Трис-гліциновий буфер, pH 8,3 – 100 мл; хлористий кальцій – 1 г; хлористий марганець – 10 мг; хлористий магній – 10 мг; аденозин-5'-фосфат – 50 мг.

По закінченні інкубації розчин з субстратом зливають і гель багаторазово промивають водою, або 1% $CaCl_2$ (3 – 5 змін по 10 – 20 хвилин кожна).

Потім гель обробляють 20 хвилин у 2% розчині хлориду (цитрату, ацетату) кобальту. Далі гель багаторазово промивають

водою і занурюють на 2 хвилини у розчин 1% Na_2S або сульфїду амонїю. Гель промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді чорних смуг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,2 М Трис-малеатний буфер, pH 7,2 – 5 мл; 0,2% розчин нітрату свинцю – 30 мл; 0,1 М розчин сульфату магнію – 5 мл; 1,25% розчин аденозин-5'-фосфату – 10 мл. Інгібуючу дію свинцю можна знизити за допомогою комплексоутворювача тирону (бренкатехін-3,5-дисульфату).

Інкубують гель 0,5–2 години, 37 °С. Потім розчин зливають, гель обполіскують дистильованою водою і обробляють 2 хвилини у розчині 1% Na_2S або сульфїду амонїю. Гель промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді коричнево-чорних смуг.

У варіанті 2 замість зазначеного буфера можна брати 0,1 М сукцінат-натрієвий буфер, pH 6,5 до його кінцевої концентрації 0,05 М.

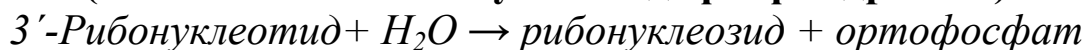
Іони цинку і, особливо, нікелю практично повністю інактивують фермент; «неспецифічні» фосфатази при цьому зберігають активність.

Деякі автори вважають оптимальним pH для ферменту – 9,2, інші – рекомендують значення pH 7,5. Деякі форми ферменту активні у кислому середовищі (pH 3,5–5,5). Однак, у нейтральному і, особливо, кислому середовищі підвищується розчинність фосфату кальцію. У таких випадках замість хлориду кальцію застосовують розчинну сіль свинцю (варіант 2).

Можуть виявлятися також неспецифічна нуклеотидаза (КФ 3.1.3.31 – нуклеотид-фосфогідролаза) та полінуклеотид-3'-фосфогідролаза (КФ 3.1.3.32).

3'-Нуклеотидаза

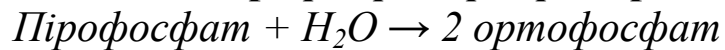
(КФ 3.1.3.6 3'-Рибонуклеотид-фосфогідролаза)



Виявляється, як й 5'-нуклеотидаза, тільки в якості субстрату застосовується аденозин-3'-фосфат.

Можуть виявлятися також неспецифічна нуклеотидаза (КФ 3.1.3.31 – нуклеотид-фосфогідролаза) та полінуклеотид-3'-фосфогідролаза (КФ 3.1.3.32).

**Пірофосфатаза неорганічна (димер)
(КФ 3.6.1.1 Пірофосфат–фосфогідролаза)**

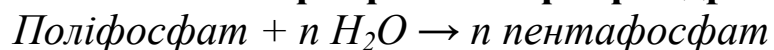


Інкубаційний розчин для лужної пірофосфатази. Розчиняють 1,088 г пірофосфату натрію ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) у 20 мл дистильованої води, додають 10 мл 6% розчину хлориду заліза ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$). Виникаючий білий осад розчиняють шляхом додання по краплям 10% розчину карбонату натрію; слід запобігати надмірної кількості лугу. Доводять pH суміші до 7,2–7,3 доданням 1 М розчину соляної кислоти. Розбавляють дистильованою водою до 100 мл та додають 0,9 г NaCl . Даний розчин повинен бути свіжоприготовленим. Безпосередньо перед використанням до нього додають по краплям 1 мл 10% розчину хлориду магнію, незначна мутність розчину не заважає виявленню.

Інкубаційний розчин для кислої пірофосфатази. Готують, як наведено вище, суміш пірофосфату та хлориду заліза. Розчин центрифугують. До осаду додають 10 мл дистильованої води і розчиняють, додаючи по краплям 10% розчин карбонату натрію. Доводять pH до значення 4,7–6,0 (за допомогою 1 М HCl) та доливають водою до об'єму 100 мл. Розчин витримують 2–3 години при кімнатній температурі, потім додають 100 мл 0,5 М ацетатного буферу, pH 3,5. Кінцеве значення pH отриманого розчину – 3,7–4,0.

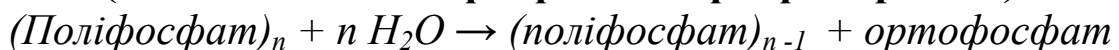
Гель інкубують при температурі 37 °С 3 години (лужна пірофосфатаза), або 1 годину (кисла). Промивають двома порціями 0,9% розчину NaCl по 15 хвилин у кожній порції. Потім гель обробляють 2 хвилини у 1% розчині сульфід амонію або натрію, після чого промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді зелених смуг. Забарвлення не стійке.

**Поліфосфатаза. Ендополіфосфатаза. Метафосфатаза
(КФ 3.6.1.10 Поліфосфат–поліфосфогідролаза)**



Метафосфатаза. Екзополіфосфатаза

(КФ 3.6.1.11 Поліфосфат–поліфосфогідролаза)



Розчини для виявлення лужної поліфосфатази. Розчин субстрату (повинен бути свіжоприготовленим): 96 мг безводного триполіфосфату натрію у 100 мл води (2 мМ розчин). Інкубаційний розчин: до 50 мл розчину субстрату додають 1 мл 6 мМ розчину

ацетату свинцю, pH 6,0 (доводиться оцтової кислотою) і 10 мл вероналового буферу з pH 8,5–9,0. Суміш повинна злегка опалесценцювати. Якщо опалесценція зникає, треба додати невелику кількість розчину солі свинцю. Додаючи $NaOH$ або HNO_3 , доводять pH до 8,7.

Розчини для виявлення кислої поліфосфатази. *Розчин субстрату* (повинен бути свіжоприготовленим): 48 мг безводного триполіфосфату натрію у 100 мл 0,05 М ацетатного буферу, pH 4,0 (1 мМ розчин). *Інкубаційний розчин*: до 50 мл розчину субстрату поступово додають 6 мМ розчин ацетату свинцю у 0,05 М ацетатному буфері, pH 4 до появи опалесценції.

Гель інкубують тільки у свіжоприготовлених розчинах, оскільки усі субстратні суміші нестійкі. Суміші мусять мати невелику опалесценцію. Якщо розчин стає прозорим або випадає осад, необхідно приготувати нову суміш.

Інкубують 1–2 години при температурі 37 °С. Потім гель обполіскують 0,05 М ацетатним буфером, pH 4, дистильованою водою та обробляють 2 хвилини у 1% розчині сульфід амонію або натрію, після чого промивають до знебарвлення фону. У місцях локалізації ферменту випадає коричнювато-чорний осад сульфід свинцю.

Протеїнази. Ендонептидази. Протеолітичні ферменти (у більшості випадків – мономер)

(КФ 3.4.21- КФ 3.4.24- Пептидил–пептидгідролази)

*Розщеплюють пептидні зв'язки, що знаходяться
усередині поліпептидного ланцюга*

Варіант 1. Протеолітичну активність можна визначати по розщепленню желатину. Для цього при полімеризації у розчин мономерів поліакриламід до додають желатин до кінцевої концентрації 0,1%. По завершенні електрофорезу гелі інкубують у відповідному буфері при 26–28 °С протягом 18 годин. Оскільки для більшості відомих протеїназ іони кальцію є активаторами, у середовище можна додати $CaCl_2$ до кінцевої концентрації 1 мМ. Після інкубації гелі фарбують розчином кумасі *R 250*, або іншим барвником на білок. У місцях знаходження протеїназ спостерігається ослаблення, або відсутність забарвлення: отримують так званий желатиназний профіль.

Варіант 2. Гель замочують у необхідному буфері для отримання необхідного значення *pH*. Якщо аналізується фермент, якій знаходиться у неактивованому стані (наприклад, пепсиноген), провадять необхідну обробку (наприклад, 2 години у 0,1 М соляній кислоті для виявлення пепсину).

Потім гель заливають буфером, якій містить бичачий сироватковий альбумін (кінцева концентрація 0,5%) та амідом чорний (0,1%).

Фермент виявляється у вигляді білих смуг на синьому фоні.

Варіант 3. Гель поміщають на засвічену та проявлену фотоплівку або пластинку. Стежать за тим, щоб між гелем та фотопластинкою не було пухирців повітря. Тривалість інкубації залежить від активності ферментів і підбирається експериментально. Потім фотопластинку промивають водою. Наявність ферментної активності спостерігають у вигляді білих смуг на чорному фоні.

Хімоустатин у концентрації 0,15 мкг/мл на 50% інгібує хімотрипсин. Він слабкіше впливає на активність папаїну (таке ж інгібування концентрацією 7,5 мкг/мл), катепсину *B* (2,6 мкг/мл), катепсину *D* (49,0 мкг/мл), катепсину *A* (62,5 мкг/мл). У всіх зазначених дозах хімоустатин не діє на трипсин та плазмін.

Трипсин інгібується сураміном (антриполом; байером 205; германином; фурно 309) при концентрації 0,001–0,01 мМ (1,5–15 мг/л).

Тозиллізинхлорометилкетон інактивує трипсин, але не впливає на хімотрипсин. Тозилфенілаланінхлорометилкетон, навпаки, пригнічує активність хімотрипсину і не діє на трипсин. Специфічним інгібітором обох ферментів є фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ; *PMSF*; α -толуолсульфонілфторид).

Слід відмітити, що дані методи є ефективними у випадку високої ферментної активності у зразку.

Рибонуклеаза;

лужна (РНКаза I) та кисла (РНКаза II) рибонуклеази (мономер)

(КФ 3.1.4.22 Рибонуклеїнат-3'-пиримидино-

олігонуклеотидгідролаза та

КФ 3.1.4.23 Рибонуклеїнат-3'-олігонуклеотидгідролаза)

Раніше класифікували як КФ 2.7.7.16 та КФ 2.7.7.17 Рибонуклеат-2'-нуклеотидо-трансфераза, циклуєча

Каталізує ендонуклеотичне розщеплення РНК у положенні 3'-нуклеотидного залишку з формуванням проміжних продуктів реакції 2':3'-цикло-фосфатів

Варіант 1. Метод з використанням екзогенних фосфатаз: див. варіант 1 вияву дезоксирибонуклеаз. Замість ДНК у розчин додається будь-який комерційний препарат РНК (наприклад, дріжджової).

Фермент строми ретикулоцитів кроля має оптимум *pH* 5,8. Для інших рибонуклеаз оптимальні значення *pH* знаходяться у лужній зоні від 7,5 до 8. У такому разі слід застосовувати лужну фосфатазу.

Варіант 2. Метод з використанням желатинової плівки: див. варіант 2 вияву дезоксирибонуклеаз. Замість ДНК у розчин додається будь-який комерційний препарат РНК.

Можуть виявлятися також екзонуклеази типу рибонуклеїнат-5'-нуклеотидгідролази (КФ 3.1.4.20) та ферменти типу нуклеїнат-3'-олігонуклеотидгідролаз (КФ 3.1.4.7), наприклад, фосфодиестераза селезінки і ендонуклеаза одноланцюгових нуклеїнових кислот (КФ 3.1.4.21).

Фосфатаза кисла (мономер, димер, тетраметр))

(КФ 3.1.3.2 Фосфогідролаза моноєфірів ортофосфату, кислий оптимум)

Моноєфір ортофосфорної кислоти + H₂O → спирт + ортофосфат

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,05 М ацетатний буфер, *pH* 5,0 (HCl) – 100 мл; чорний К сіль – 100 мг; α-нафтилфосфат натрієва сіль – 100 мг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,2 М ацетатний буфер, *pH* 5,0 (HCl) – 100 мл; міцний гранатовий GBC сіль – 36 мг; 1 М MgCl₂ × H₂O – 1 мл; α-нафтилфосфат натрієва сіль – 37 мг.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,5 М ацетатний буфер, *pH* 5,0 – 100 мл; міцний синій RR сіль – 20 мг; полівінілпіролідон – 5 г; фосфат нафтолу AS-MX – 16 мг.

Фосфат нафтолу розчиняють у 1 мл диметилформаміду, потім додають полівінілпіролідон та буфер. Добре перемішують, фільтрують і добавляють сіль діазонію, яка попередньо розчинена у декількох краплях диметилформаміду. Інкубують 30–60 хвилин, 37 °С. Фермент виявляється у вигляді інтенсивних синіх зон. Гелі зберігають у розчині етанол–вода–оцтова кислота (10:30:1).

Примітки такі ж, як за виявлення лужних фосфатаз. У деяких випадках ліпше забарвлення отримується використанням 0,05 М цитратного буфера, pH 4,5–5,5. Сіль діазонію – чорний *K* можна замінити на міцний гранатовий та навпаки. Перед фарбуванням обов'язково довести pH гелю до необхідного значення.

Наведені варіанти не є придатними для виявлення кислої фосфатази еритроцитів, оскільки остання не здатна розщеплювати штучні субстрати, в яких фосфорна кислота знаходиться у ефірному зв'язку з нафтолом; фермент еритроцитів може гідролізувати фенолфталеїндифосфат.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: 0,05 М ацетатний буфер, pH 5,0–5,3 – 50 мл; нітрат або ацетат свинцю – 60–80 мг; 3% розчин β -гліцерофосфату натрію – 5 мл. Інгрідієнти розчиняють у порядку їх перелічення у прописі.

Інкубація при 37 °С протягом від 15 хвилин до 24 годин. Після інкубації гель обполіскують спочатку у дистильованій воді, потім швидко (декілька секунд, не більш 30) у 2% оцтовій кислоті, потім знову промивають дистильованою водою. Гель обробляють 2 хвилини у 1% розчині сульфід амонію або натрію, після чого промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді коричнево-чорних смуг.

Іони арсенату, молібдату, оксалату, фториду інгібують кислі фосфатази (1–10 мМ). На відміну від лужних фосфатаз, ЕДТА, ціанід, цистеїн та глутатіон практично не впливають на активність кислих фосфатаз.

Кисла фосфатаза печінки, нірок, передміхурової залози інгібується у розчині 1 мМ L(+)-винної кислоти (150 мг у літрі).

Фосфатаза кисла еритроцитів

Інкубаційний розчин: 0,05 М цитратний буфер, pH 6,0; фенолфталеїндифосфат – 0,005 М.

Зазначеним розчином просочують папір «ватман № 17». Насиченим папером накривають поверхню гелю та інкубують 4 години при 37 °С. Потім папір знімають та обприскують концентрованим розчином аміаку. У зонах, де локалізовано фермент, виникає рожеве забарвлення.

Всі реактиви повинні мати кваліфікацію «хімічно чисті», вода – деіонізованою, оскільки фермент дуже чутливий до важких металів.

Фосфатаза лужна (мономер, димер)

(КФ 3.1.3.1 Фосфогідролаза моноєфірів ортофосфату, лужний оптимум)

Моноєфір ортофосфорної кислоти + H₂O → спирт + ортофосфат

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,06 М боратний буфер, рН 9,7 – 100 мл; міцний синій RR сіль – 50 мг; 0,01 М MgCl₂ – 1 мл; α-нафтилфосфат натрієва сіль – 50 мг.

Варіант 2. Інкубаційний розчин: 0,02 М Трис-НCl буфер, рН 8,8 – 50 мл; міцний синій RR сіль – 100 мг; 0,01 М MgCl₂ – 1 мл; α-нафтилфосфат натрієва сіль – 100 мг; вода – 50 мл.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,1 М Трис-НCl буфер, рН 8,6 – 100 мл; міцний гранатовий GBC сіль – 50 мг; MgCl₂ – 120 мг; α-нафтилфосфат натрієва сіль – 20 мг.

Спочатку розчиняють нафтилфосфат у 1 мл ацетону, потім додають сіль діазонію, далі буфер та інші компоненти. Інкубують у темряві при кімнатній температурі або при 30–37 °С. Зони локалізації ферменту забарвлюються у сірій колір. Гелі фіксують 20 хвилин у 3–5% розчині оцтової кислоти, потім промивають водою. Забарвлюючи суміші приготують безпосередньо перед використанням.

У якості субстрату можна також використовувати β-нафтилфосфат чи нафтол-АС-фосфат. Як активатор, крім солі магнію, можна додатково додати сіль марганцю.

За дослідження сироватки спостерігається неспецифічне забарвлення зон альбуміну, церулоплазміну та гаптоглобіну у вигляді світло-жовтих смуг.

Варіант 4. Інкубаційний розчин: буфер з рН 9,0–9,4 – до 50 мл; 3% розчин β-гліцерофосфату натрію – 10 мл; 2% розчин хлориду кальцію – 20 мл; 5% розчин хлориду, або сульфату магнію – 1 мл. Можна застосовувати мєдналовий, амедиоловий або Трис-НCl буфери.

Гель інкубують при температурі 37 °С 1–2 години (діапазон: від 5 хвилин до 4–5 годин). Після інкубації гель промивають водою і занурюють на 10 хвилин у 2% розчин будь-якої розчинної солі кобальту. Гель знову промивають водою та обробляють 5 хвилин у 1% розчині сульфід амонію або натрію. Гель промивають до

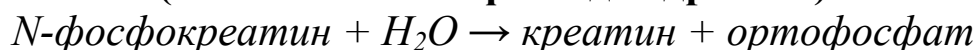
знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді коричнево-чорних смуг.

Специфічність фарбування можна проконтролювати за допомогою інгібітору ферментів: 0,1 М *NaF*. Цистеїн та йод (1 мМ), арсенат натрію (10 мМ) ефективно інгібують лужну фосфатазу.

Лужні фосфатази різних тканин ссавців (крім, ферментів кишечника) інгібуються левамізолгидрохлоридом (тетрамізолом) у концентрації 0,01 мМ (24 мг/л).

Фосфоамідаза

(КФ 3.9.1.1 Фосфоамід–гідролаза)



Можливо, ідентичний ферментам D-Глюкозо-6-фосфат–фосфогідролазі (КФ 3.1.3.9), а також фосфопротеїн–фосфогідролазі (КФ 3.1.3.16); реагує з N-фосфоаргініном та іншими фосфоамідами.

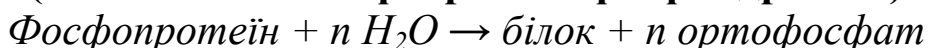
Розчин А. Розчиняють 2,08 г *n*-хлоранілідифосфінової кислоти у 15 мл 1 М *NaOH* і доливають водою до об'єму 100 мл.

Розчин Б. Розчиняють 534 мг малеїнової кислоти у 5 мл 1 М *NaOH*, додають воду до об'єму 100 мл. Потім додають 175 мг *NaCl* та 94 мг *Pb(NO₃)₂*. Суміш стає мутною. Її обережно нагрівають до розчинення. Додають 4,5 мл розчину А, нагрівають до 42–44 °С та фільтрують.

Гель інкубують 1,5–4 години, 42 °С. Промивають у 0,1 М цитратному або ацетатному буфері, *pH* 4,5, або у 0,1 М лимонній кислоті до зникнення дифузного білого осаду, який може покривати поверхню гелю. Потім гель промивають дистильованою водою та обробляють 2 хвилини у 1% розчині сульфиду амонію або натрію, після чого промивають водою до знебарвлення фону. У місцях локалізації ферменту з'являються коричнювато-чорні смуги.

Фосфопротеїн фосфатаза. Протеїнфосфатаза (гетеротример)

(КФ 3.1.3.16 Фосфопротеїн–фосфогідролаза)



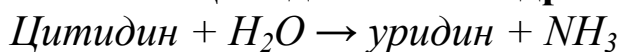
Інкубаційний розчин: 0,2 М ацетатний буфер, *pH* 5,5 – 25 мл; ацетат свинцю – 120 мг; казеїн (яечний альбумін, фосфовітін) – 100мг; дистильована вода – до 100 мл. Інгібуючу дію свинцю можна знизити за допомогою комплексоутворювача тирону (бренкатехін-3,5-дисульфону).

Гель інкубують (кімнатна температура або 37 °С) декілька годин, постійно похитуючи розчин; тривалість інкубації залежить від активності ферментів досліджуваного зразку.

Після інкубації гель обполіскують у дистильованій воді. Гель обробляють 2 хвилини у 1% розчині сульфиду амонію або натрію, після чого промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді коричнево-чорних смуг.

Фермент з селезінки реагує також з фенолфосфатами та фосфамідами.

**Цитидиндезаміназа (тетраметр)
(КФ 3.5.4.5 Цитидин–аміногідролаза)**

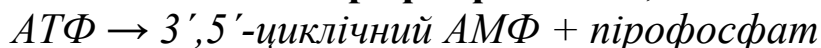


Інкубаційний розчин: 0,05 М Трис-ацетатний буфер, рН 7,5 – 50 мл; дитіотреїтол – 7 мг; НСТ – 35 мг; цитидин – 35 мг.

Гель інкубують 1–2 години при температурі 37°С. В місцях локалізації ферменту виникає темно-сине забарвлення.

КЛАС 4. ЛІАЗИ (СИНТАЗИ)

**Аденілатциклаза. Аденілілциклаза (олігомер)
(КФ 4.6.1.1. АТФ–пірофосфат-ліаза, циклююча)**



Гель витримують 1 – 2 години при температурі 37 °С у розчині складу:

0,05 М Трис-ацетатний буфер, рН 7,5 – 50 мл; хлористий кальцій – 250 г; хлористий магній – 250 г; фторид натрію – 100 мг; теофілін (або амінофілін) – 1 мг; піруват – 10 мг; аденозин-5'-(β, γ-імідо)-трифосфат (5'-аденілілімідодифосфат) – 75 мг.

Аденілілімідодифосфат – специфічний субстрат аденілатциклази, якій одночасно є ефективним конкурентним інгібітором багатьох АТФаз. Даний субстрат не можна замінити на АТФ без втрати специфічності забарвлення. Замість теофіліну у якості інгібітору цАМФ-фосфодиестерази можна використовувати 1-метил-3-ізобутилксантин (у кількості у десять разів менш за теофіліну), а також кофеїн.

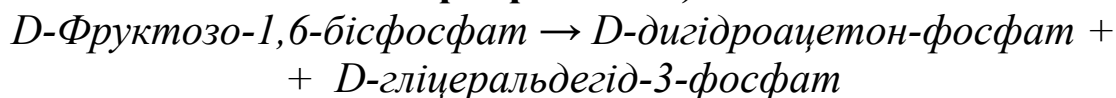
По закінченні інкубації розчин з субстратом зливають і гель багаторазово промивають (3–5 змін по 10–20 хвилин кожна) 1% розчином хлористого кальцію. Можна використовувати також розчин CaCl_2 у 75% етанолі.

Потім гель обробляють 5–20 хвилин у 2% розчині хлориду (цитрату, ацетату) кобальту. Далі гель багаторазово промивають водою і занурюють на 2 хвилини у розчин 1% Na_2S , або сульфід амонію. Гель промивають до знебарвлення фону. Зони ферменту виявляються у вигляді чорних смуг.

В залежності від завдань дослідження та з метою виявлення різних форм ферменту можна використовувати різні буферні системи із значеннями pH від 6,0 до 9,0. У кислих середовищах фосфати кальцію та магнію ліпше розчинюються, у такому разі до інкубаційного розчину додатково вводять нітрат або ацетат свинцю, але не більше 3 мМ.

**Альдолаза. Зимогексаза. Фруктозобісфосфат-альдолаза
(тетраметр)**

**(КФ 4.1.2.13 D-Фруктозо-1,6-бісфосфат– D-гліцеральдегід-3-
фосфат-ліаза)**



Раніше класифікували як кетозо-1-фосфат–альдегід-ліазу, КФ 4.1.2.7

Варіант 1. Розчин для осаджування продуктів реакції. Розчиняють 5,5 г $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ і 7 г NH_4Cl у 35 мл 5 М розчину NH_4OH , залишають на одну годину, фільтрують та додають до фільтрату 60 мл 4 М розчину NH_4OH .

Вихідні розчини очищеного субстрату

А. Змішують 40 мл 4% розчину гексозодифосфату натрію з 20 мл розчину для осаджування, залишають на 30 хвилин та фільтрують.

Б. Змішують 20 мл 4% розчину гексозодифосфату натрію з 20 мл розчину для осадження та 20 мл дистильованої води, залишають на 30 хвилин та фільтрують.

Робочі розчини субстрату

А. 10 мл розчину А очищеного субстрату + 1,7 мл 0,1 М розчину йодацетату натрію + 5 мл дистильованої води.

Б. 15 мл розчину Б очищеного субстрату + 2,5 мл 0,1 М розчину йодацетату натрію + 7,5 мл дистильованої води.

Гель інкубують у робочому розчині А або Б протягом 1–2 годин при температурі 37 °С. Потім гель переносять у 2% розчин ацетату кобальту на 5–10 хвилин. Промивають водою та обробляють 1–2 хвилини у 1% розчині сульфіді амонію або натрію, після чого промивають водою до знебарвлення фону. У місцях локалізації ферменту з'являються коричнювато-чорні смуги.

В якості субстрату застосовують фруктозо-1,6-дифосфат. Фермент реагує також з кетозо-1-фосфатом з утворенням дигідроксиацетон-фосфату та альдегіду.

Варіант 2. Гель покривають фільтрувальним папером, якій попередньо просочений 2% розчином натрієвої солі фруктозо-1,6-дифосфату у 0,1 М Трис-ацетатному буфері, рН 7,6, що містить 0,002 М йодацетат. Інкубують 15–60 хвилин при температурі 37 °С. Після інкубації папір обробляють 20 секунд розчином азотнокислого срібла у ацетоні. Потім папір підсушують на повітрі. Сухий папір занурюють на 30 секунд у 0,5 М розчин *NaOH*. У місцях локалізації ферменту з'являються чорні смуги. Коричневий фон гелю відмивають за допомогою 2% розчину тіосульфату натрію.

Для виготовлення розчину азотнокислого срібла у ацетоні готують насичений водний розчин *AgNO₃* та додають 0,5 мл цього розчину до 100 мл ацетону.

Карбоангідраза. Карбонатдегідратаза (мономер)

(КФ 4.2.1.1 Карбонат–гідро-ліаза)



Варіант 1. Для виготовлення інкубаційного середовища готують два розчини. Розчин А: до 1,0 мл 0,1 М *CoSO₄* додають 6,0 мл 0,05 М *H₂SO₄*. Розчин Б: розчиняють 1 г *NaHCO₃* у 50 мл 0,1 М *Na₂SO₄*. Цей розчин підготовляють безпосередньо перед використанням. Перед інкубацією розчин Б вливають у розчин А і сумішшю заливають гель.

Витримують гель 1,5–2 години при температурі 18–20 °С. Потім протягом 2 хвилин промивають гель у дистильованій воді та обробляють 1 хвилину розведеним розчином *(NH₄)₂S* (можна скористатися сульфідом натрію). Багаторазово промивають водою. У

місцях розташування ферменту виникає чорний або коричневий осад сульфїду кобальту.

Варіант 2. Гель покривають фільтрувальним папером, просоченим 0,1% розчином бромтимолового синього у 0,1 М вероналовому буфері, *pH* 9,0. Через 10 хвилин папір знімають і на поверхню гелю направляють струмінь вуглекислого газу. Фермент виявляється у вигляді жовтих смуг на блакитному фоні. Метод дуже чутливий, але забарвлення не стійке.

Варіант 3. Інкубаційний розчин: 0,1 М фосфатний буфер, *pH* 7,2 – 100 мл; міцний синій *RR* сіль – 50 мг; β -нафтилацетат натрієва сіль – 20 мг.

Нафтилацетат розчиняють у 1 мл ацетону, перед використанням змішують з рештою інгредієнтів.

Зони ферменту забарвлюються у рожево-червоний колір. Для того, щоб даним засобом відрізнити досліджуваний фермент від естераз застосовують специфічний інгібітор карбоангідрази – ацетазоламід (5-ацетиламіно-1,3,4-тіадіазол-2-сульфонамід у кінцевій концентрації 0,01 мкМ (2,2 мкг/ л). Сульфаніламід (*n*-амінобензолсульфамід) пригнічує активність при концентрації 1 мкМ (172 мкг/л). У деяких видів ЕДТА інгібує фермент, тому не рекомендується здійснювати електрофорез в буферних системах, які містять ЕДТА.

Кофактором ферменту є іони цинку.

**Фосфоенолпіруваткарбоксилаза (димер, тетрамер)
(КФ 4.1.1.31 Ортофосфат: оксалоацетат–карбокси-ліаза, що фосфорілює)**

Ортофосфат + оксалоацетат \rightarrow *фосфоенолпіруват* + H_2O + CO_2

Інкубаційний розчин: 0,1 М трициновий буфер, *pH* 7,0 – 100 мл; полівінілпіролідон (ПВП 40) – 500 мг; міцний синій *BB* сіль – 100 мг; 1 М розчин хлориду магнію – 1 мл; фосфоенолпіруват – 120 мг; $NaHCO_3$ – 160 мг.

Гель інкубують у темряві при температурі 30 °С.

За даною методикою можливий прояв близького за реакціями, що каталізуються, ферменту фосфопіруваткарбоксилази (КФ 4.1.1.38 **Пірофосфат: оксалоацетаткарбокси-ліаза**). Останній фермент здійснює наступні реакції: *Пірофосфат + оксалоацетат* \rightarrow

фосфоенолпіруват + ортофосфат + CO_2 , а також:
Фосфоенолпіруват + ортофосфат → піруват + пірофосфат.

КЛАС 6. ЛІГАЗИ (СИНТЕТАЗИ)

Глутамінсинтетаза (октамер)

(КФ 6.3.1.2 L-Глутамат: аміак–лігаза, що формує АДФ)

$ATP + L\text{-глутамат} + NH_3 \rightarrow АДФ + \text{ортофосфат} + L\text{-глутамін}$

Варіант 1. Інкубаційний розчин: 0,067 М Трис-малеатний буфер, рН 7,2 – 150 мл; АТФ – 523 мг; цистеїн солянокислий – 290 мг; гідроксиламін солянокислий – 230 мг; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 815 мг; глутамат калію – 1,8 г.

Гель витримують у вищенаведеному розчині 10 хвилин при 37 °С. Потім його поміщують у суміш (1:1) 50% HCl та 10% $FeCl_3$ у 0,2 М HCl з 24% ТХО. У місцях локалізації ферменту виникає червоне забарвлення. Барвник швидко дифундує, тому гель необхідно документувати одразу після фарбування.

Варіант 2. Реакційний розчин: 0,1 М трициновий буфер, рН 7,4 – 100 мл; АДФ натрієва сіль – 20 мг; $Na_2AsO_4 \cdot 7 H_2O$ – 400 мг; гідроксиламін солянокислий – 150 мг; $MgSO_4$ – 250 мг; ЕДТА тетранатрієва сіль – 60 мг; L-глутамін – 750 мг. Забарвлюючий розчин: ТХО – 5 г; $FeCl_3$ – 10 г; 2,5 М HCl – до 100 мл.

Реакційний розчин готують безпосередньо перед використанням. Інкубація при 37°С триває від 15 хвилин до 3 годин. Потім розчин зливають. Гель промивають дистильованою водою та поміщають у забарвлюючий розчин на 5–10 хвилин. Виявляються смуги зелено-коричневого кольору. Забарвлення не стійке.

Варіант 3. Реакційний розчин: розчинити 100 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ у 2 мл води, потім додати 3 мл Трис- HCl буферу, рН 8,0, 200 мг глютамінової кислоти, 80 мг АТФ і 0,2 мл концентрованого NH_4OH . Довести рН до 9,3 за допомогою 1,0 М $NaOH$. Забарвлюючий розчин: 0,8 г L-аскорбинової кислоти, 6 мл розчину молібдату амонію. Для готування останнього 2,5 г молібденової кислоти амонію тетрагідрату розчиняють у суміші 8 мл концентрованої сірчаної кислоти і 92 мл води.

Гель інкубувати у реакційному розчині біля 1 години. Реакційний розчин зливають, але гель не промивають, а обробляють

15 хвилин 50% розчином ацетону. Потім гель промивають дистильованою водою і заливають забарвлюючим розчином при 37°C.

2.9. Візуалізація ферментів після SDS-електрофорезу

Деякі ензими здатні зберегти свою активність після SDS-електрофорезу. Така процедура надає можливість визначити не тільки кількість ізоформ, а також встановити таку важливу ознаку білкової молекули, як маса. Зрозуміло, що маса є більш реальним, інформативним показником ніж неконкретна відносна електрофоретична рухливість, значення якої можуть істотно змінюватися в залежності від умов електрофорезу.

Для того, щоб отримати можливість виявлення ферментативної активності білка після SDS-електрофорезу в першу чергу необхідно вилучити аніонний детергент з метою відновлення активної конформації молекул. Зазвичай, електрофорез здійснюють без додання меркаптометанолу, який порушує внутришньомолекулярні і міжланцюгові S–S зв'язки білків. Крім того, препарат не обробляють високою температурою: використовують 37 °C і навіть кімнатну температуру. Нижче наведена схема обробки гелів після SDS-електрофорезу для прояву ферментативної активності. Така процедура дозволяє виявити активність протеїназ, класичної пероксидази, СОД та інших ензимів ропани. Звісно, що для кожного ферменту з конкретного матеріалу необхідна експериментальна перевірка методики.

– Проби розчиняють у буфері без меркаптоетанолу з доданням SDS до 2 % (маса / маса) і проводять SDS-електрофорез за звичайною схемою.

– Після завершення електрофорезу гель переносять на 1 годину у водний розчин Тритону X-100 у концентрації 1,5 – 2 % (об'єм / об'єм) для видалення аніонного детергенту і ренатурації білкових молекул. Дану процедуру за необхідності можна повторити, або здійснити її 2 – 3 рази по 30 – 40 хв кожний раз з новим розчином Тритону X-100.

– Оброблений гель витримують 20 хв у буфері, необхідному для виявлення ферментативної активності.

– Здійснюють стандартну процедуру виявлення досліджуваної ферментативної активності.

2.10. Аналіз електрофореграм

2.10.1. Основні показники електрофоретичного спектра та загальноприйнята номенклатура ізоформ

Показники електрофоретичного спектра білків (ферментів) можна розділити на дві групи: ознаки, що характеризують спектр у цілому, та властивості окремих фракцій (смуг).

За аналізу електрофоретичного спектра в цілому по-перше, підраховується загальна кількість смуг білка (ферменту) у кожному окремому зразку. Це свідчить, з одного боку, про кількість фракцій, тобто про ступінь поліморфізму (розмаїття) білків (ензимів) у даному організмі (тканині, клітині і т. д.). С іншого боку, показує ефективність методу розділення, який застосовано експериментатором.

Слід зазначити, що встановлена кількість смуг не обов'язково повинна співпадати з кількістю генетично детермінованих форм білка, тобто *ізоферментів*. Поняття «ізофермент» («ізоензим», «ізозим»), «алелозим» («алозим») мають чіткий генетичний зміст: це форми, що виникають завдяки генетично обумовленим варіаціям у первинній структурі білка, тобто контролюються окремими, конкретними генами (ізозим) та їх алелями (алозим). Для того, щоб встановити генетичну природу різних форм білка, які виявлені після електрофоретичного розділення, слід провадити спеціальний генетичний аналіз.

У випадках, коли не з'ясовано генетичний контроль досліджуваних білків, бажано користуватися більш нейтральними визначеннями, як «множинні форми» ензимів (білків), «множинні молекулярні форми» ензимів (білків), «ізоформи» ензимів, «електрофоретичні фракції» ензимів (білків), «електрофоретичні форми» ензимів (білків), «форми» ензимів (білків). Для позначення варіантів білка, які виявляють після електрофорезу, застосовують також термін «електроморфи», «множинні ізотипи».

Як правило, кількість смуг ензиму на електрофореграмах більше, ніж генетичних варіантів. У кращому випадку це може бути пов'язано з посттрансляційними модифікаціями. Однак, поява додаткових смуг може виникати у ході отримання та електрофоретичного аналізу досліджуваного матеріалу. Такі випадки є небажаними і у відповідальних експериментах необхідно їх

встановлювати. У порівняльних дослідженнях, навпаки, ці явища можуть навіть нести додаткову інформацію.

Наступною характеристикою електрофоретичного спектра є особливості розташування та розподілу множинних форм білка на електрофореграмі. Загальноприйнятим є нумерування смуг відповідно їх електрофоретичної рухливості: менший порядковий номер дається формі, якій властива більша швидкість руху до анода. На електрофореграмах або діаграмах, що демонструють результати досліджень, слід вказувати місцезнаходження анода або катода.

Часто спостерігаються спектри, які мають складні комбінації ізозимів, коли у межах головної групи існує декілька форм, які розрізняються електрофоретичною рухливістю (суб-фракції, суб-зони). У таких випадках можна надавати номери головним групам, а суб-зони позначаються малими латинськими літерами в якості нижнього індексу. Наприклад: 1_a, 1_b, 1_c, 2_a, 2_b і т. д. Для однозначної ідентифікації конкретних ізозимів слід вказувати додаткові ознаки (якщо вони відомі): молекулярну масу, субодичну структуру і т. п. Субодичні рекомєндовано позначати великими латинськими літерами, або малими грецькими. Не рекомєндується вводити позначення, що пов'язані з тканинним походженням ізоформ.

Інші показники спектра пов'язані з характеристикою конкретних смуг. Важливою характеристикою форми білка, що формує окрему смугу на електрофореграмі, є відносна електрофоретична рухливість – *Rf*. Відносна електрофоретична рухливість визначається у частках як співвідношення відстані, яке пройшла дана форма білка, до відстані, що пройшов лідируючий барвник. Наприклад, смуга барвника просунулася на 110 мм, а дана фракція білка – на 55 мм. Відносна електрофоретична рухливість – *Rf* – даного білка буде складати 0,50 (55 : 110). Часто смуга має певну ширину, тоді належить визначати відстань від її центру. Гель після обробок, фарбування, зокрема, може змінити лінійні розміри, а смуга барвника – знебарвитись, тому необхідно по закінченні електрофорезу будь-яким способом відмітити місце розташування барвника. Простіший варіант – відрізати гель по лінії смуги лідируючого барвника. Вебер та Осборн рекомєнують для розрахунку відносної електрофоретичної рухливості наступну формулу:

$$Rf = \frac{\text{Відстань, пройдена білком}}{\text{Відстань, пройдена барвником}} \times \frac{\text{Довжина гелю до забарвлення}}{\text{Довжина гелю після забарвлення}}$$

Зустрічаються випадки, коли ступінь електрофоретичної гетерогенності ферментів (наприклад, кислої фосфатази у людини) дуже варіює від метода досліджень та типу тканин. Іноді, за дуже високої гетерогенності досліджуваних білків, є сенс спростити кількісний аналіз електрофореграм. У такому разі відокремлюють та аналізують не загальну кількість смуг, а лише окремі зони без урахування внутрішньозональної гетерогенності.

Наступна важлива характеристика окремої форми білка – кількість матеріалу в ній у масових одиницях та рівень її ферментної активності. Про це (з певними застереженнями) може свідчити інтенсивність забарвлення відповідної смуги. Чим сильніше забарвлення, чим ширше смуга, тим більшу абсолютну кількість білка та більшу загальну активність має дана форма. Проблеми з інтерпретацією результатів пов'язані з декількома моментами.

По-перше, належить визначити діапазон, у якому зберігається лінійна залежність: «інтенсивність забарвлення» / «кількість білка» (або «ферментна активність»). За межами цього діапазону порушується однозначна відповідність між інтенсивністю забарвлення та досліджуваною характеристикою електрофоретичної фракції, тобто погіршується точність вимірів.

По-друге, подібну електрофоретичну рухливість можуть мати різні за природою та функціями білки. Це, за аналізом конкретних ферментів у тотальному екстракті тканин, з одного боку, буде завищувати абсолютну кількість даної фракції ферменту, з другого – занижувати її питому активність. Часто практикується зіставлення результатів фарбування «на білок» з результатами виявлення ферментної активності. Однак, згідно з вищезазначеними причинами це може не бути корисним щодо розв'язання даного питання. Без додаткових біохімічних аналізів немає можливості встановити, з чим пов'язаний визначений рівень загальної активності конкретної електрофоретичної фракції ферменту: з абсолютною кількістю ферменту чи з питомою активністю цієї форми ферменту. Необхідне попереднє очищення фракції білка (ензиму) та наступне електрофоретичне його розділення або екстрагування білка із даної електрофоретичної смуги та подальше біохімічне дослідження.

Після одержання даних про кількість та активність окремих електрофоретичних фракцій можна визначити ще два показника спектру: 1) сумарну кількість (ферментну активність) матеріалу у всьому електрофоретичному спектрі;

2) відносні частки від загального спектра кожної електрофоретичної фракції.

Відносно визначення сумарної кількості (активності) матеріалу у спектрі слід попередити, що дане значення не буде відповідати повній кількості (активності) білка у зразку. В залежності від застосованої системи електрофорезу буде визначатися кількість (активність) тільки тих білків, що потрапили до розділення у поділяючому гелі: кислих – у лужній системі, або лужних – у кислій електрофоретичній системі. Інші білки, які не увійшли у поділяючий гель та рухалися у протилежному напрямку у верхній буфер, зрозуміло, не можуть бути враховані. Тільки у випадку використання двобічного електрофорезу, або електрофорезу з використанням іонних детергентів можна встановити повну кількість (активність) білка у досліджуваному зразку.

Відносні частки фракцій у спектрі, з одного боку, є характеристиками окремих електрофоретичних фракцій, з другого – відображають особливості спектра в цілому, а саме – особливості розподілу матеріалу по певним фракціям.

2.10.2. Документування і кількісний аналіз електрофореграм

Найбільш простий засіб документування, якій не потребує складних приладів, але й найбільш трудомісткий – це виготовлення рисунків. Для цього гель переглядають у минаючому світлі і фіксують на рисунку основні особливості електрофореграм: кількість смуг, їх відстань від лінії старту, інтенсивність забарвлення та товщину смуги, лінію лідируючого барвника. Інтенсивність забарвлення окремої смуги оцінюють візуально та умовно позначають ступенем чорніння: інтенсивну смугу звичайно заштриховують повністю без пробілів, для менш інтенсивних використовують різні варіанти несущільного штрихування з пробілами та крапки, границі слабкіше забарвлених смуг визначають переривчастими лініями та крапками. Даний підхід може бути достатньо інформативним особливо у порівняльних дослідженнях. Для зазначеної оцінки електрофореграм необхідно мати будь-який прилад, що просвічує гель, або просто скористатися вікном вдень. Візуальна оцінка інтенсивності забарвлення даної смуги певним ступенем дозволяє орієнтовно визначити кількість та ферментну активність даної форми білка (за наявності стандартів), а також

активність даної електрофоретичної фракції порівняно з активністю інших фракцій.

Розповсюдженим методом документування електрофореграм є фотографування. Кращі результати отримують при використанні високочутливої фотоплівки типу Мікрат-200, Мікрат-300 та інших. Фотографують за стандартною технікою. Застосовують прилад для висвітлення гелю у минаючому світлі; можна використовувати також загальне додаткове освітлення об'єкту за допомогою ламп, які встановлюють над фотоапаратом. Для збільшення контрасту можна підібрати відповідні кольорові фільтри. Головну увагу слід звертати на рівномірність освітлення та відсутність зображення джерела світла.

Поширення комп'ютерної техніки дозволяє застосовувати зручний метод збереження інформації про електрофоретичне розділення – сканування за допомогою спеціальних приладів та передання інформації у пам'ять комп'ютера. Одночасно це дає можливість подальшої кількісної обробки електрофореграм у комп'ютері за допомогою спеціальних програм.

Нерідко прибігають до прийомів збереження та консервації самого гелю. Поліакриламідні гелі можна тривалий час зберігати у воді, до якої додають мертіюлят до кінцевої концентрації 0,01%. Інші гелі, у тому числі поліакриламідні, можна висушити. Рекомендації по техніці висушування можна знайти у відповідній літературі.

У нинішній час більше використовують кількісний аналіз електрофореграм з застосуванням спеціального обладнання, що одночасно являється й документуванням результатів електрофоретичного дослідження. За цими приладами зображення електрофореграм переводиться у графічну форму у вигляді кривих, на яких смуги виглядають як піки, висота яких відповідає інтенсивності забарвлення смуги. Площа під окремим піком відповідає загальній кількості (загальній активності) білка у даній смугі, а відношення цієї площі до площі під усім спектром – відносній кількості (активності) даної форми білка у всьому спектрі. Для такого аналізу використовують різноманітні мікроденситометри. Ці прилади дають графічне зображення електрофореграм, одночасно обчислюють його та видають відповідний звіт. Однак, мікроденситометри є дуже недешевими та малодоступними для багатьох лабораторій. Корисним і менш коштовним є використання спеціальних комп'ютерних програм для обчислювання

електрофореграм, зображення яких було скановано та збережено у пам'яті комп'ютера. Існують різні варіанти обчислювальних комп'ютерних програм. Є програми, які спеціалізовані для білків крові, інші – універсальні. З останніх можна рекомендувати вітчизняну програму «АнаИС» (Аналізатор ізображений спектрів – Аналізатор зображень спектрів), розроблену Д. Г. Рибалкою та М. А. Поджарським (podzharsky@ukr.net).

За кількісним аналізом електрофореграм для отримання достовірних та повторюваних результатів слід звернути особливу увагу на один важливий момент: повинна спостерігатися лінійність залежності між кількістю білка (ензиму) в смугі і ступенем її забарвлення (барвником або кольоровими продуктами ферментативної реакції).

Так, при використанні амідочорного для виявлення білків слід враховувати, що різні білки можуть зв'язувати різну кількість цього барвника. Більш того, після електрофорезу на плівках з ацетату целюлози було встановлено, що кількість барвника, яка зв'язується білком, залежить також і від довжини електрофоретичного шляху досліджуваного білка. У зв'язку з вищезазначеним у дуже точних аналітичних дослідженнях необхідно будувати калібровочні криві для кожного білкового компонента. У цьому сенсі більш придатним є кумасі яскраво-блакитний. Він забарвлює різні білки приблизно однаково. Крім того, лінійність залежності «інтенсивність забарвлення : кількість білка» при фарбуванні розчинами кумасі зберігається в більшому діапазоні, ніж за фарбування амідочорним.

При аналізі фотографій електрофореграм належить пам'ятати, що помилка у обчисленнях може збільшитися за рахунок нелінійності чутливості фотоплівки та інших особливостей фотографічного процесу.

При визначенні білків по ферментативній активності в багатьох випадках спостерігається практично лінійна залежність між кількістю ферменту та інтенсивністю забарвлення його смуги на електрофореграмі. Однак, це також не є абсолютним, що було показано при аналізі ізоформ лактатдегідрогенази.

Для того, щоб зменшити вплив вищезазначених негативних моментів на точність розрахунків, слід дотримуватися двох простих та доступних правил:

- 1) аналізувати мінімально можливу кількість білка,

2) ферментна реакція повинна здійснюватись за час, достатній для того, щоб субстрат та інші компоненти повністю увійшли в гель, а реакція пройшла практично до кінця (тобто час інкубації повинен мати оптимальне, а не мінімальне значення).

2.10.3. Використання результатів електрофоретичного аналізу в генетиці

Аналіз ізоферментів є надійним і відтвореним методом. Ізоферменти являють собою кодомінантні маркери і підходять для оцінки всіх генетичних параметрів популяцій і генетичного картування. Кодомінантність алелів ізоформ ферментів дозволяє без додаткових експериментів розрізнити гомозиготні генотипи від гетерозиготних. Недоліком ізоферментного аналізу є те, що маркери пов'язані з фенотипом. На них можуть впливати фактори навколишнього середовища, що може позначатися на результатах і складності їх інтерпретації. Унаслідок диференційованого прояву генів, що має місце на різних стадіях розвитку або в різних тканинах, для всіх експериментів необхідно використовувати однотипний матеріал.

Таким чином, набір смуг на електрофореграмах можна інтерпретувати з генетичної точки зору, як це робиться з будь-яким фенотипичним маркером. Головна проблема полягає в правильному трактуванні отриманого спектра ізоформ.

З одного боку необхідна інформація про кількість локусів, що кодують даний фермент, та кількість алелів в локусі. З іншого боку потрібно знати четвертинну структуру досліджуваного ферменту: скільки поліпептидних ланцюгов формують його структуру, однакові вони, або один поліпептид білка відрізняється від іншого, володіє окремий мономер ферментною активністю або ні. Від усього цього залежатимуть особливості спектрів у гомозиготних і гетерозиготних особин. Нижче буде розглянуто кілька варіантів залежності спектра від структури білка та його генетичного контролю.

Тільки певна частина ферментів є мономерними білками, тобто складаються з одного поліпептидного ланцюга. Підраховано, що кількість мономерних ферментів складає приблизно 28% від загальної кількості, решта ферментів є мультимерними – мають два або більше поліпептидів: – 43% димерів, 4% тримерів, 24% тетрамерів і 1% октамерів.

Найбільш проста картина розподілу изозимів спостерігається у випадку однолокусного контролю ферментів у диплоїдних організмів:

1) **мономерний** фермент – гомозиготи даватимуть одну смугу, гетерозиготи – дві;

2) **димерний** фермент – гомозиготи для різних алелів даватимуть по одній смузі, відповідно конкретному алелю, гетерозиготи – три смуги (з причини довільній асоціації двох поліпептидів);

у випадку тетраплоїдного організму у гетерозигот буде вже 10 ізоформ димерного ферменту;

3) **тримерний** фермент – у гомозигот спостерігатимуться по одній смузі, у гетерозигот – чотири;

4) **тетрамерний** фермент – гомозиготи даватимуть одну смугу, гетерозиготи – шість.

Існують також мультімерні ферменти, в яких поліпептидні ланцюги визначаються різними локусами. Тому виникнення гетеромерних ізоферментів може значно ускладнити картину розподілу смуг на електрофореграмах.

Так, у гетерозигот димерний фермент, що контролюється двома локусами з двома алелями кожний, буде мати 10 ізоформ, тобто на електрофореграмі виявиться 10 смуг ферменту.

Для розрахунку очікуваної кількості ізоформ ферменту в гетерозиготах Харрис і Хопкінсон [Harris, Hopkinson, 1976] запропонували формулу:

$$i = \frac{(L + h + n - 1)!}{n!(L + h - 1)!}$$

де i – кількість изозимів, L – загальна кількість локусів, h – кількість гетерозиготних локусів, n – кількість субодиниць у ферменті.

У порівняльних дослідженнях може бути корисним так званий коефіцієнт поліморфізму спектру – P :

$$P = \frac{n_p}{n_p + n_{np}} \times 100 \%$$

де n_p – кількість смуг, завдяки яким має місце поліморфізм, n_{np} – кількість смуг, які присутні в усіх зразках.

Поліморфними вважаються смуги, що проявляються в одних зразках, а в інших зразках – не спостерігаються (або помітні дуже

слабко). Цей коефіцієнт характеризує ступінь розмаїтості досліджуваного білка (ферменту) в межах певної групи порівнюваних зразків (видів, організмів, тканин і т. і.).

У деяких дослідах може виникати інтерес до визначення рівня «індивідуального» (внутрішнього) розмаїття (складності) спектра для кожного зразка та порівняння його з таким для інших зразків. Рішення даного завдання не буде очевидним, якщо у спектрах порівнюваних зразків присутня однакова кількість електрофоретичних форм, що виявляються, але відносні частки цих форм неоднакові у різних зразків. Для цього можна запропонувати розрахунок коефіцієнту «індивідуального» («внутрішнього») розмаїття – K_p :

$$K_p = \frac{n(n-1)}{\sum s_i^2}, \text{ де}$$

n – кількість електрофоретичних фракцій (смуг) у даному зразку, s_i - відносна частка окремої електрофоретичної фракції від загального спектру досліджуваного зразка.

Чим більше коефіцієнти P та K_p , тим вище поліморфізм та рівень індивідуального розмаїття.

Генетична інтерпретація результатів електрофорезу може здійснюватися за наступними показниками.

Поліморфність популяції – P . Розраховується як частка (частота) поліморфних локусів від усієї кількості досліджуваних локусів. Лocus вважається поліморфним, якщо кількість алелів в ньому ≥ 2 . Щоб знизити вплив алелів, що рідко зустрічаються, використовують так званий критерій поліморфності, який формулюється наступним чином. Лocus вважається поліморфним, якщо частота найбільш розповсюдженого алеля цього локусу не перевищує певну межу. Звичайно приймають бар'єр у 95% частоти зустрічальності, деякі автори використовують величину 99%.

Частота алеля:

$$p_a = (n_{aa} + \frac{n_{ab}}{2}) / N,$$

де p_a – частота алеля «а», n_{aa} – кількість у виборці гомозигот по алелю «а», n_{ab} – кількість у виборці гетерозигот по алелю «а», N – об'єм досліджуваної вибірки.

Кількість генотипів N_g , виникаючих на основі випадкової комбінації « n » алелів в одному аутосомному локусі:

$$N_g = \frac{n(n+1)}{2},$$

де n – кількість алелів в одному аутосомному локусі.

Наявна (спостережувана) гетерозиготність з окремого локусу H :

$$H = N_H / N,$$

де N_H – кількість особин, гетерозиготних за даним локусом; N – загальна кількість досліджених особин.

Середня наявна гетерозиготність популяції по досліджуваним локусам H_o :

$$H_o = \frac{\sum H_i}{N},$$

де H_i – наявна гетерозиготність по кожному окремому досліджуваному локусу, N – кількість досліджуваних локусів, як поліморфних, так і мономорфних.

Середня наявна гетерозиготність поліморфних локусів H_p :

$$H_p = \frac{\sum H_i}{N_p}$$

де H_i – наявна гетерозиготність по кожному окремому поліморфному локусу, N_p – кількість досліджуваних поліморфних локусів.

Очікувана гетерозиготність по окремому локусу $H_{очікув}$:

$$H_{\text{очікує}} = 1 - \left[(p_1)^2 + (p_2)^2 + \dots + (p_n)^2 \right],$$

де p_1, p_2, p_n – частоти алелів локусу.

Середня очікувана гетерозиготність популяції по досліджуваним локусам або по поліморфним локусам розраховується як середня спостережувана гетерозиготність. Максимальна очікувана гетерозиготність залежить від кількості алелів и представлена дискретними величинами від 0,5 до 1 и розраховується за формулою:

$$H_{\text{очікує}}^{\text{max}} = 1 - \frac{1}{n},$$

де n – кількість алелів у локусі.

Дефіцит гетерозиготності:

$$D = H_{\text{очікує}} - H_O,$$

де D – дефіцит гетерозиготності, $H_{\text{очікує}}$ і H_O – очікувана та наявна гетерозиготність.

Похибка частоти алеля:

$$s_{p_i} = \left(\frac{p_i(1-p_i)}{2n} \right)^{\frac{1}{2}},$$

де p_i – частота алеля, n – величина вибірки.

Похибка частоти генотипа (алозимного фенотипу):

$$s = \left(\frac{pG_i(1-pG_i)}{n} \right)^{\frac{1}{2}},$$

де pG_i – частота генотипу, n – розмір вибірки.

Стандартна похибка середньої гетерозиготності:

$$s_H = \left(\frac{\sum (H_i - H)^2}{m(m-1)} \right)^{\frac{1}{2}},$$

де H – середнє значення гетерозиготності, m – кількість локусів.

На підставі результатів генетичного аналізу можна провадити порівняння між досліджуваними сукупностями організмів (різними експериментальними групами, популяціями, видами і т. д.). Для цього використовують різні підходи і показники.

Статистика F . Вона дозволяє проаналізувати структури підрозділених популяцій. Ця статистика також може бути використана для вимірювання генетичної віддаленості між субпопуляціями. Концепція статистики F заснована на ідеї, що ті субпопуляції, які не схрещуються між собою, будуть мати різні частоти алелів на відміну від загальної популяції.

У статистиці F генетична структура популяції описується рівнянням:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

F_{IT} – демонструє дефіцит або надлишок середніх гетерозигот у групі популяцій (субпопуляцій):

$$F_{IT} = 1 - \frac{H_I}{H_T}.$$

F_{IS} – свідчить про дефіцит або надлишок середніх гетерозигот у кожній популяції (субпопуляції):

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_I}{H_S}.$$

F_{ST} – показує ступінь диференціації гена між популяціями (субпопуляціями) відносно частот алелів.

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T}.$$

В наведених формулах H_T – очікувана гетерозиготність у загальній популяції, H_I – наявна гетерозиготність у групі популяцій,

H_S – середня очікувана гетерозиготність, розрахована з кожної субпопуляції.

Якщо F_{ST} має значення від 0 до 0,05, то генетична диференціація вважається маленькою, при значенні від 0,05 до 0,15 – середньою, від 0,15 до 0,25 – великою, понад 0,25 – дуже великою.

Індекс генетичної подібності (ІГП) розраховують по формулі Джеффріса-Матусіти:

$$ІГП = 1 - \frac{\sum \left[1/2 \sum (pG_1^{1/2} - pG_2^{1/2})^2 \right]^{1/2}}{L},$$

де pG_1 і pG_2 – частоти аналогічних генотипів у першій та другій вибірці відповідно, L – кількість поліморфних локусів.

Якщо значення ІГП більше, ніж 0,92, то різниця між вибірками вважається недостовірною. При значеннях ІГП від 0,85 до 0,92 різниця є достовірною при рівні значущості 5%, при величині ІГП менше, ніж 0,85 – високо достовірною.

ІГП можна використовувати для побудови дендрограм, формування груп в яких провадили зважуванням парно-груповим методом.

Індекс генетичної схожості I по М. Нею:

1) I по одному локусу:

$$I = \frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum a_i^2 \cdot \sum b_i^2}},$$

де a_i – сума частот i -алелів в популяції а, b_i – сума частот цих же алелів в популяції б.

2) I за декількома локусами:

$$I = \frac{J_{ab}}{\sqrt{J_a \cdot J_b}},$$

де J_{ab} , J_a , J_b – середні арифметичні сум частот i -алелів $\sum a_i b_i$, $\sum a_i$, $\sum b_i$ для кожного локусу у популяціях а і б відповідно.

Значення генетичної схожості можуть варіювати від 0 (між популяціями немає спільних алелей), до 1 (частоти алелей в популяції однакові).

Індекс генетичної відстані D по М. Нею:

$$D = -\ln(I),$$

де I – індекс генетичної схожості по Нею.

Ступінь генетичної різниці між двома підвидами, що відносяться до одного виду, відповідає генетичній відстані, рівній 0,17–0,22.

Приклад: аналіз генетичної структури і порівняння різних вибірок рапани за спектром лужної фосфатази (ALP)

На рис. 1 представлено електрофоретичні спектри лужної фосфатази 20 особин рапани з різних акваторій Чорного моря: Одеської затоки біля м. Одеси (№№ 1–10) та узбережжя Криму біля мису Тарханкут (№№ 11–20).

У спектрі лужної фосфатази рапани виявляються дві зони з двома ізоформами в кожній.

Перша зона – ALP-1 – представлена формами з відносною рухливістю 0,23 (ALP-1²³) і 0,26 (ALP-1²⁶). У другій, менш рухливій зоні – ALP-2 – ізоформи мають Rf 0,12 (ALP-2¹²) і 0,14 (ALP-2¹⁴).

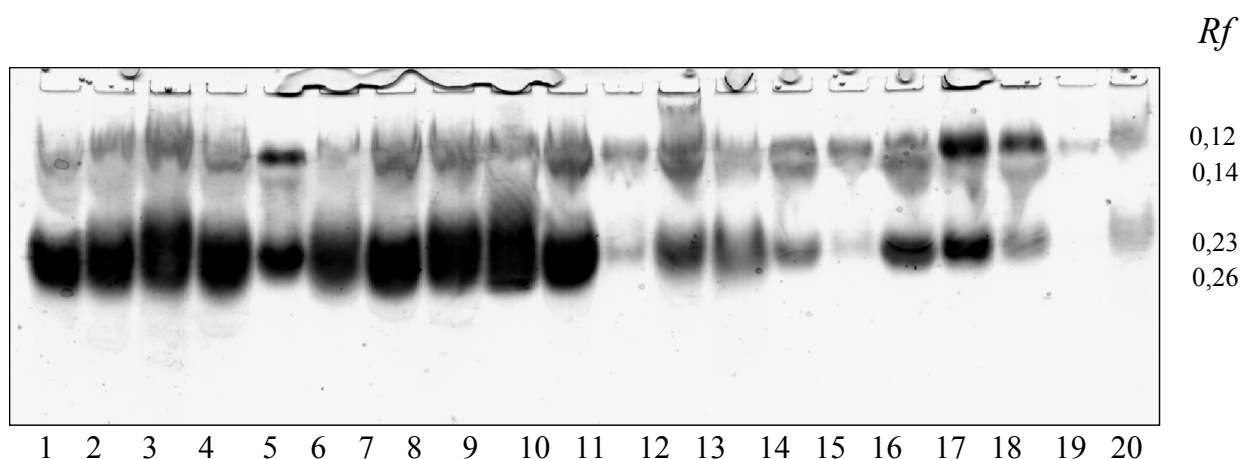


Рис. 1. Електрофоретичні спектри лужної фосфатази досліджуваних особин рапани (пояснення в тексті)

Оскільки генетика детермінування лужної фосфатази для рапани невідома, можна робити тільки припущення відносно генетичної

основи спостережуваних фенотипів електрофоретичних спектрів цього ферменту. На підставі отриманих результатів і літературних даних можна запропонувати дві робочі гіпотези щодо генетичного контролю лужної фосфатази у рапані.

Наявність двох блоків ізоформ може свідчити про існування двох генетичних локусів лужної фосфатази, що узгоджується з даними, отриманими на ссавцях. Крім того, для досліджуваних організмів встановлено, що лужна фосфатаза є мономером або димером. Якщо прийняти мономерну організацію лужної фосфатази та дволокусний генетичний контроль, слід спостерігати у кожному блоці (ALP-1 і ALP-2) по одній смузі при гомозиготності або по дві – у випадку гетерозиготності по кожному локусу, що фактично й спостерігається.

Дволанцюгова четвертинна структура ферменту передбачає за однолокусного детермінування наявність у гетерозиготному стані тільки трьох смуг. Однак у досліджуваних електрофоретичних спектрах зустрічаються випадки, які можна трактувати як чотирьохсмугові, що слугує підтвердженням гіпотези про наявність двох локусів з двома алелями кожний.

З іншого боку зустрічаються фенотипи, в яких одночасно виявляються по одній формі із зони ALP-1 та ALP-2. Але за гомозиготності по одному алелю є неможливим експресія альтернативного алелю. Таким чином, найбільш вірогідною слід вважати гіпотетичну модель про мономерну організацію молекул лужної фосфатази у рапани та дволокусну її детермінацію з двома алелями у кожному локусу.

На підставі проведеного аналізу спектрів лужної фосфатази можна наступним чином відобразити фенотипи (генотипи) особин, що представлені на рисунку:

№№ 1–4, 6–8, 10, 13 – $ALP-1^{23/26} // ALP-2^{12/14}$,
№ 9 – $ALP-1^{23/26} // ALP-2^{12/12}$,
№№ 11, 15, 19, 20 – $ALP-1^{23/23} // ALP-2^{12/12}$,
№№ 5, 12, 14, 18 – $ALP-1^{23/23} // ALP-2^{12/14}$,
№ 16 – $ALP-1^{26/26} // ALP-2^{12/14}$,
№ 17 – $ALP-1^{26/26} // ALP-2^{12/12}$.

Наступним кроком буде підрахунок кількості фенотипів.

Далі проводимо розрахунки відповідно вищенаведеним в цьому розділі формулам, як показано у таблиці 4. Очікувані величини обчислюють відповідно закону Харді-Вайнберга.

Як видно з проведених розрахунків, розподіл генотипів відповідає закону Харді-Вайнберга тільки для виборки з мису Тарханкут за ознакою ALP-2. В інших випадках стан досліджуваних груп не є рівноважним.

**Матриця розрахунку генетичної структури досліджуваних
вбірок рапани**

Місця збору моллюска	Одеська затока	Мис Тарханкут	Одеська затока	Мис Тарханкут
Локуси	ALP-1	ALP-1	ALP-2	ALP-2
Кількість фенотипів за алелями	23/23 = 1	23/23 = 7	12/12 = 0	12/12 = 5
	23/26 = 9	23/26 = 1	12/14 = 9	12/14 = 4
	26/26 = 0	26/26 = 2	14/14 = 1	14/14 = 1
	$\Sigma = 10$	$\Sigma = 10$	$\Sigma = 10$	$\Sigma = 10$
Частоти генотипів за алелями	23/23 = 0,1	23/23 = 0,7	12/12 = 0,0	12/12 = 0,5
	23/26 = 0,9	23/26 = 0,1	12/14 = 0,9	12/14 = 0,4
	26/26 = 0,0	26/26 = 0,2	14/14 = 0,1	14/14 = 0,1
Кількість алелів	23/ = 11	23/ = 15	12/ = 9	12/ = 14
	26/ = 9	26/ = 5	14/ = 11	14/ = 6
	$\Sigma = 20$	$\Sigma = 20$	$\Sigma = 20$	$\Sigma = 20$
Частоти алелів	23/ = 0,55	23/ = 0,75	12/ = 0,45	12/ = 0,70
	26/ = 0,45	26/ = 0,25	14/ = 0,55	14/ = 0,30
Очікувані частоти генотипів	23/23 = 0,3025	23/23 = 0,2025	12/12 = 0,5625	12/12 = 0,4900
	23/26 = 0,4950	23/26 = 0,4950	12/14 = 0,3750	12/14 = 0,4200
	26/26 = 0,2025	26/26 = 0,3025	14/14 = 0,0625	14/14 = 0,0900
Очікувана кількість фенотипів	23/23 = 3,025	23/23 = 2,025	12/12 = 5,625	12/12 = 4,900
	23/26 = 4,950	23/26 = 4,950	12/14 = 3,750	12/14 = 4,200
	26/26 = 2,025	26/26 = 3,025	14/14 = 0,625	14/14 = 0,900
χ^2	1,36	2,03	0,34	0,00
	3,31	3,31	2,02	0,01
	2,03	1,36	3,03	0,01

	$\Sigma = 6,69$	$\Sigma = 6,69$	$\Sigma = 5,38$	$\Sigma = 0,02$
Наявна гетерозиготність	0,90	0,10	0,10	0,40
Очікувана гетерозиготність	0,50	0,38	0,50	0,42
Дефіцит (надлишок) гетерозиготності	-0,41	0,28	-0,41	0,02

Одеська вибірка: $ALP-1^{23/23} = 1$, $ALP-2^{12/12} = 0$.

$ALP-1^{23/26} = 9$, $ALP-2^{12/14} = 9$.

$ALP-1^{26/26} = 0$, $ALP-2^{14/14} = 1$.

Тарханкутська вибірка: $ALP-1^{23/23} = 7$, $ALP-2^{12/12} = 5$.

$ALP-1^{23/26} = 1$, $ALP-2^{12/14} = 4$.

$ALP-1^{26/26} = 2$, $ALP-2^{14/14} = 1$.

На засаді розрахунку генетичної структури можна оцінити ступінь генетичної схожості досліджуваних вибірок (табл. 5).

Таблиця 5

Розрахунок генетичної диференціації досліджуваних вибірок за Нея

Показник	Розрахунок
J_{ab}	$\frac{0,55 \cdot 0,75 + 0,45 \cdot 0,25 + 0,45 \cdot 0,70 + 0,55 \cdot 0,30}{2} = 0,5025$
J_a	$\frac{0,55^2 + 0,45^2 + 0,45^2 + 0,55^2}{2} = 0,5050$
J_b	$\frac{0,75^2 + 0,25^2 + 0,70^2 + 0,30^2}{2} = 0,6025$
I	$\frac{0,5025}{\sqrt{0,5050 \cdot 0,6025}} = 0,911$
D	$-\ln 0,911 = 0,040$
Висновок	Генетична диференціація між досліджуваними виборками мінімальна і знаходиться на рівні різниці між субпопуляціями

Слід зауважити, що вищевказані дані наведені як приклад і можуть не віддзеркалювати реальний стан досліджуваних популяцій. Необхідний об'єм вибірки залежить від багатьох факторів (мутаційної мінливості, інтенсивності міграцій, ступеню ізольованості досліджуваної групи особин і т. д.), а також від випадковості відбору особин для дослідження. В зв'язку з цим не є можливим рекомендувати необхідну кількість дат. Як правило, вивчають декілька десятків особин, чим більше об'єм вибірки, тим більш обґрунтовані будуть висновки.

З методами генетичного аналізу можна докладно ознайомиться у підручниках Ю. П. Алтухова [2003], Ф. Айали [1984] та П. Ф. Рокицького [Рокицкий, 1978].

2.11. Деякі особливості роботи з тканинами рапани

Вилучення м'якого тіла рапани з мушлі. Прикметними ознаками рапани, як і всіх черевоногих, є втрата білатеральної симетрії (редуються праві органи мантийного комплексу) і наявність мушлі з цілісного куска складної архітектури, що прикриває спину тварини. Крім того, при дії будь-якого подразника м'яке тіло молюска втягується всередину раковини і стає дуже неподатливим. У зв'язку з цим, прижиттєве вилучення м'якого тіла з мушлі без його пошкодження вкрай важке: доводиться або обережно розбивати раковину, або наркотизувати тварину. Найбільш простим і зручним способом є попереднє заморожування молюска при температурі не більше -18°C протягом ночі або доби. У такому стані матеріал можна зберігати до аналізу. Для дослідження м'яке тіло молюска після легкого відтаювання обережно витягують з мушлі і препарують на поверхні холодогену (льоду або іншого пристосування), щоб запобігти суттєвого нагрівання матеріалу.

Попередня обробка тканини для електрофоретичного дослідження. Оскільки тканини рапани містять багато речовин, що запобігають проведенню електрофорезу і виявленню ферментної активності, перед аналізом корисно здійснювати хоча б часткове очищення гомогенату. Задовільні результати дає наступна процедура.

Тканину гомогенізують у буфері для екстракції наступного складу: 0,05 М Трис- HCl (pH 6.8), 0,01% дитіотреїтол, 0,01% аскорбінова кислота, 0,01% натрієва сіль ЕДТА, 1% тритон X-100.

Співвідношення тканина : буфер (маса у мг : об'єм у мкл) складає 1:1. Проби розтирають безпосередньо у пластикових центрифужних пробірках, 3–5 разів піддають заморожуванню-відтаюванню, після чого центрифугують на холоді (+4°C) 20 хв при 10000 g. До надосадової рідини додають три об'єми охолодженого (–28 °C) ацетону. Білковий осад отримують центрифугуванням за вищезазначених умов і обробляють протягом ночі охолодженим бутанолом при +2 – +4 °C. Після центрифугування матеріал висушують декілька діб при –28 °C, а потім при кімнатній температурі 2–4 години. Осад розчиняють у співвідношенні 1:1 (вихідна тканина у мг : розчин у мкл) у буфері для екстракції з доданням 15% цукрози і невеликої кількості бромфенолового синього. Отримані препарати тканин використовують для електрофорезу.

Системи для електрофоретичного розділення білків-ферментів з тканин рапани. Для багатьох ферментів (пероксидаз, супероксиддисмутаза, НАД(Ф)-оксидаз, диафораз, естераз, фосфатаз, амілаз, протеїназ та ін.) цілком задовільні результати дає використання системи Орнстейна та Девіса. Її можна застосовувати як з формуючим гелем, так і без нього. При цьому концентрація поліакриламідного гелю може коливатися від 5–7% для амілаз, до 12,5–15,0% для протеїназ, для більшості вищеперелічених ферментів є доречним 7,5–8,5% ПААГ.

Для оксидоредуктаз, що окиснюють органічні кислоти, рекомендують використовувати різні буферні системи: Трис-ЕДТА-боратну, Трис-цитратну, Трис-ЕДТА-цитратну, Трис-малеатну та інші. Вибір тієї чи іншої системи залежить від особливостей досліджуваної тканини молюска та від можливостей дослідника.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ТА РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

До розділу 1

1. *Горячковский А. М.* Клиническая биохимия. 2-е изд. // Одесса : Астропринт, 1998. – 608 с.
2. *Ланкин В. З., Тихадзе А. К., Ковалевская А. Л., Лемешко В. В., Вихерт А. М.* Возрастные изменения глутатион-S-трансферазной и глутатионпероксидазной активности цитозоля печени крыс // ДАН СССР. – 1981. – Т. 261, № 6. – С. 1467–1470.
3. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* / Учеб. пособие под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 271 с.
4. *Сирота Т. В.* Новый подход в исследовании процесса автоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы мед. химии. – 1999. – № 3. – С. 263–273.
5. *Стальная Д. И., Гаришвили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Сб.: Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
6. *Asada K.* Radical production and scavenging in the chloroplasts. In: Photosynthesis and the environment. – Netherlands: Kluwer Acad. Publ., Dordrecht., 1996. – P. 123–150.
7. *Chelikani P., Fita I., Loewen P. C.* Diversity of structures and properties among catalases // Cell. Mol. Life Sci. – 2004. – Vol. 61, № 2. – P. 192–208.
8. *Davies K. J. A.* Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – P. 9895–9901.
9. *Marnett L. J.* Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde // Mutat. Res. – 1999. – Vol. 424, № 1–2. – P. 83–95.
10. *McCord J. M., Fridovich I.* Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) // J. Biol. Chem. – 1969. – Vol. 244. – P. 6056–6063.
11. *Murlund S.* Normal Cu, Zn superoxidedismutase, Mn- SOD, catalase and glutathione peroxidase in werner's syndrome / Murlund S.,

- Nordenson J., Back O. // *J. Gerontol.* – 1981. – V. 36, № 4. – P. 405–409.
12. *Muller F. L., Lustgarten M. S., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H.* Trends in oxidative aging theories // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol 43, № 4. – P. 477–503.
13. *Ogawa K., Kanematsu S., Asada K.* Intra and extra-cellular localization of «cytosolic» CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls // *Plant Cell Physiol.* – 1996. – Vol. 37. – P. 790–799.
14. *Marnett L. J.* Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 424, № 1–2. – P. 83–95.

До розділів 2.1–2.7

1. *Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М. : Мир, 1982. – 448 с.
2. *Гауровиц Ф.* Химия и функции белков. – М. : Мир, 1965. – 528 с.
3. *Гердон Дж., Спандидос Д., Уилки Н. и др.* Транскрипция и трансляция. Методы / Под ред. Б. Хеймса и С. Хиггинса. – М. : Мир, 1987. – 400 с.
4. *Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др.* Генетика изоферментов. – М. : Наука, 1977. – 275 с.
5. *Костюковская О. М.* Определение гликопротеидов в электрофоретических фракциях сыворотки крови // *Современные методы в биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1964. – С. 123-129.
6. *Левитес Е. В.* Генетика изоферментов растений. – Новосибирск : Наука, 1986. – 144 с.
7. *Линнеке П.* Электрофорез в геле агарозы // *Иммунологические методы* / Под ред. Х. Фримеля. – М. : Мир, 1979. – С. 209 – 220.
8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Глава 5. Гель-электрофорез. – С. 157 – 185. // М. : Мир, 1984. – 480 с.
9. *Маурер Г.* Диск-электрофорез. – М. : Мир, 1971. – 188 с.
10. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М. : Наука, 1981. – 288 с.
11. *Туркова Я., Мелоун Б., Мотл О. и др.* Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам / Под ред. О. Микеша. – М. : Мир, 1982. – Ч. II. 381 с.

12. *Фримель Х.* Аналитический диск-электрофорез // Иммунологические методы / Под ред. Х. Фримеля. – М. : Мир, 1979. – С. 221 – 233.
13. *Штрауб Ф.Б.* Биохимия. – Будапешт: Akadémiai Kiadó. Изд-во Академии наук Венгрии. – 772 с.
14. *Davis B. I.* Disc elektrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121, N 2. – P. 404-427.
15. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – N. 227. – P. 680-685.
16. *Lambin P., Fine J. M.* Molecular weight of proteins by electrophoresis in linear polyacrylamide gradient gels in the absence of denaturing agents // Anal. Biochem. – 1979. – V. 98. – P. 160-168.
17. *O'Farrell P. H.* High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J. Biol. Chem. - 1975. – V. 250. – P. 4007-4021.
18. *Weber K., Osborn M. J.* The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem. - 1969. – V. 244. – P. 4406-4412.

До розділу 2.8–2.9

1. *Берстон М.* Гистохимия ферментов. – М. : Мир. – 1965. – 464 с.
2. *Биологический энциклопедический словарь* (Гл. ред. М. С. Гиляров). – М. : Советская энциклопедия, - 1989. – 864 с.
3. *Гааль Э., Медьеш Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М. : Мир, 1982. – 448 с.
4. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. – М. : Мир, 1966. – 816 с.
5. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
6. *Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П.* и др. Методы биохимического исследования растений. – Л. : Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 430 с.
7. *Иммунологические методы* / Под ред. Х. Фримеля. – М. : Мир, 1979. – 520 с.
8. *Костюковская О. М.* Определение гликопротеидов в электрофоретических фракциях сыворотки крови // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1964. – С. 123-129.

9. *Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И.* и др. Генетика изоферментов. – М. : Наука, 1977. – 275 с.
10. *Левитес Е. В.* Генетика изоферментов растений. – Новосибирск : Наука, 1986. – 144 с.
11. *Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т.* Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. – М. : Мир, 1982. – 272 с.
12. *Луппа Х.* Основы гистохимии. – М. : Мир, 1980. – 344 с.
13. *Номенклатура ферментов. Рекомендации (1972 г.)* Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций (с дополнениями по 1975 год). – М. : ВИНТИ, 1978. – 322 с.
14. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М. : Наука, 1981. – 288 с.
15. *Пирс Э.* Гистохимия. – М. : Изд-во иностранной литературы, 1962. – 964 с.
16. *Туркова Я., Мелоун Б., Мотл О.* и др. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. – М. : Мир, 1982. – Ч. II. - 381 с.
17. *Manchenko G. P.* Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. – CRC Press Inc., Boca Raton.: 2003. – 341 p.
18. *Pena L.B., Tomaro M.L., Gallego S.M.* Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons // Electronic Journal of Biotechnology. – 2006. – V. 9, I. 3. – P.258–262. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/18/>

До розділу 2.10

1. *Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 448 с.
2. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М. : Наука, 1981. – 288 с.
1. *Айала Ф.* Введение в популяционную и эволюционную генетику. – М. : Мир, 1984. – 232 с.
2. *Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях. М. : ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.

3. Бердников В. А. Молекулярно-генетические основы видообразования // Молекулярная биология. Т. 21. Структура и эволюция геномов (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР) / Под ред. В. А. Ратнера. – М.: ВИНТИ, 1985. – С. 241-272.
4. Гааль Э., Медьешу Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 448 с.
5. Гаевский Н. А. Знакомство с эволюционной генетикой: Учеб.-метод. пособие. – Красноярск: Краснояр. гос. ун-т. – 53 с.
6. Демчук О. Н., Блюм Я. Б. Построение филогенетического древа растительных тубулинов на основании гомологии их белковых последовательностей // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 3 – 9.
7. Карабанов Д. П. Генетические адаптации черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Actinopterygii: Clupeidae). – Воронеж: Издательство «Научная книга», - 2013. – 179 с.
8. Номенклатура ферментов. Рекомендации (1972 г.) Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций (с дополнениями по 1975 год). – М.: ВИНТИ, 1978. – 322 с.
9. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.
10. Анализ генетического разнообразия с данными молекулярных маркеров: обучающий модуль / Под ред. К. С. де Висенте и Т. Фултон – 2004. – Рим. Италия. – Электронный ресурс. Режим доступа: www.biodiversityinternational.org/Molecular_Markers_Volume_2_ru.p.
11. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. – М.: Мир, 1983. – 106 с.
12. Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. – Минск: Вышэйш. школа, 1978. – 448 с.
13. Топтиков В. А., Дьяченко Л. Ф., Тоцкий В. Н. Оценка спектров множественных форм ферментов с помощью показателя уровня внутреннего разнообразия системы // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, № 1. – С. 46–53.
14. Физиолого-биохимические и генетические исследования ихтиофауны Азово-Черноморского бассейна / Методическое руководство. – Ростов-на-Дону: Эверест. – 2005. – 105 с.

15. *Hannan G. L., Orick M. W.* Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae) // *American J. Bot.* – 2000. – Vol. 87, № 3. – P. 293–301.
16. *Manchenko G. P.* Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. – CRC Press Inc., Boca Raton.: – 2003. – 341 p.
17. *Molecular systematics* / ed. D. M. Hillis, C. Moritz, B. K. Mable. – 2nd ed. – Chapter 4. – Sinauer Associates, Inc. – 1996. – P. 51–120.
18. *Nei M.* The genetic distance between populations // *Amer. Naturalist.* – 1972. – Vol. 106. – P. 283–291.
19. *Pena L. B., Tomaro M. L., Gallego S. M.* Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons // *Electronic Journal of Biotechnology.* – 2006. – Vol. 9, I. 3. – P. 258–262. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/18/>.



Навчальне видання

Топтіков Валентин Анатолієвич
Єршова Олена Михайлівна
Ковтун Олег Олексійович
Лавренюк Тетяна Іванівна
Тоцький Владлен Миколайович

ГЕНЕТИКО-БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АДАПТИВНОСТІ ТВАРИН ТА ЇХ УГРУПОВАНЬ

НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК

За редакцією авторів

Підп. до друку 22.11.2017. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк. 8,14. Тираж 50 пр.
Зам. № 1687.

Видавець і виготовлювач

Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua