

Hans Bisswanger

Practical Enzymology



WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

М Е Т О Д Ы В Б И О Л О Г И И

Х.Биссвангер

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Перевод с английского
канд. хим. наук Т. П. Мосоловой

С предисловием
доктора хим. наук, профессора А. В. Левашова



Москва
БИНОМ. Лаборатория знаний

УДК 577(075.8)

ББК 28.072я73

Б65

Биссвангер Х.

**Б65 Практическая энзимология / Х. Биссвангер ; пер. с англ. —
М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017, — 328 с. : ил.**

ISBN 978-5-94774-940-3

В учебном издании, написанном известным ученым из Германии, рассмотрены теоретические основы энзимологии, применяемых в этой научной области методов, а также приведены описания основополагающих лабораторных работ.

Для студентов-химиков, биохимиков и биологов, специалистов, работающих в исследовательских и промышленных лабораториях, а также для медиков — научных работников.

УДК 577(075.8)

ББК 28.072я73

Учебное издание

Биссвангер Ханс

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*

Редактор *И. С. Бельная*

Художник *Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Компьютерная верстка: *О. А. Пелиненко*

Подписано в печать 24.07.14. Формат 60х90/16.

Уел. печ. л. 20,5.

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>

© Originally published in the English language by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, BoschstraBe 12, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany, under the title «Practical Jinzymology». Copyright 2004 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

© Перевод на русский язык, оформление. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010

ISBN 978-5-94774-94(1-3

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к русскому изданию.....	10
Предисловие .	12
Список сокращений.....	14
1 Введение .	16
2 Номенклатура ферментов	19
3 Ферментативные реакции	22
3.1 Теория ферментативной реакции.....	22
3.1.1 Порядок реакции.....	22
3.1.1.1 Реакции нулевого порядка.....	22
3.1.1.2 Реакции первого порядка.....	23
3.1.1.3 Реакции второго и более высокого порядков . . .	24
3.2 Уравнение Михаэлиса—Ментен.....	25
3.3 Теория ферментативного анализа.....	33
3.3.1 Анализ кинетической кривой.....	33
3.3.2 Проведение ферментативного анализа.....	39
3.3.2.1 Общие замечания.....	39
3.3.2.2 pH.....	42
3.3.2.3 Ионная сила и буферные растворы.....	43
3.3.2.4 Температура.....	43
3.3.2.5 Специфические компоненты.....	45
3.3.2.6 Концентрация компонентов и методические замечания.....	47
3.3.3 Активность фермента.....	49
3.3.3.1 Единицы ферментативной активности.....	49
3.3.3.2 Коэффициент поглощения.....	50
3.3.3.3 Расчет ферментативной активности.....	52
3.4 Теория сопряженных ферментативных реакций.....	55
3.4.1 Две сопряженные реакции.....	55
3.4.2 Три сопряженные реакции.....	59
3.5 Определение концентрации субстрата.....	59
3.5.1 Метод конечной точки.....	59
3.5.2 Сопряженные ферментативные реакции.....	62
3.5.3 Кинетический метод определения концентрации субстрата.....	62
3.5.4 Циклические ферментативные процессы.....	63
3.6 Методы ферментативного анализа.....	65
3.6.1 Спектральные методы.....	66
3.6.1.1 Фотометрия в УФ/видимом диапазоне.....	66
3.6.1.2 Турбидиметрия.....	74
3.6.1.3 Флуориметрия.....	75
3.6.1.4 Люминометрия.....	79
3.6.1.5 Поляриметрия.....	81
3.6.2 Электрохимические методы.....	82
3.6.2.1 pH-метр.....	82
3.6.2.2 pH-стат.....	84
3.6.2.3 Потенциометрия.....	84
3.6.3 Реакции, протекающие с выделением или поглощением газа.....	85
3.6.3.1 Аппарат Варбурга.....	85
3.6.3.2 Радиоактивная метка.....	86

3.6.3.3	Электроды для определения кислорода и углекислого газа.....	86
3.7	Ферментативный анализ.....	87
3.7.1	Общие замечания.....	87
3.7.2	Практические аспекты.....	91
3.7.3	Буферы и растворы.....	92
3.7.3.1	Теоретические аспекты.....	92
3.7.3.2	Приготовление буферов.....	93
3.7.3.3	Наиболее распространенные буферные системы и растворы.....	96
3.7.3.4	Расчет активности фермента.....	97
3.7.4	Определение оксидоредуктаз.....	99
3.7.4.1	Оптические методы.....	99
3.7.4.2	Флуоресцентные методы.....	100
3.7.4.3	Алкогольдегидрогеназа.....	100
3.7.4.4	Шикиматдегидрогеназа.....	103
3.7.4.5	L-Лактатдегидрогеназа.....	104
3.7.4.6	Изоцитратдегидрогеназа.....	106
3.7.4.7	Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа.....	107
3.7.4.8	Малатдегидрогеназа.....	108
3.7.4.9	Глюкозооксидаза.....	109
3.7.4.10	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа.....	110
3.7.4.11	Пируват:ферредоксин оксидоредуктаза.....	112
3.7.4.12	Глутаматдегидрогеназа.....	112
3.7.4.13	Оксидаза L-аминокислот.....	113
3.7.4.14	Уриказы.....	114
3.7.4.15	Каталаза.....	115
3.7.4.16	Пероксидаза.....	116
3.7.4.17	Люцифераза.....	119
3.7.5	Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГК).....	120
3.7.5.1	Определение общей активности ПДГК по восстановлению НАД ⁺	121
3.7.5.2	Определение общей активности ПДГК с регенерацией НАД ⁺	122
3.7.5.3	Пируватдегидрогеназа (липоамид).....	124
3.7.5.4	Дигидролипоацетилтрансфераза.....	125
3.7.5.5	Дигидролипоамид-дегидрогеназа.....	128
3.7.6	а-Оксoglутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДГК) . . .	130
3.7.6.1	Определение общей активности ОГДГК по восстановлению НАД ⁺	131
3.7.6.2	а-Оксoglутаратдегидрогеназа.....	132
3.7.7	Трансферазы.....	132
3.7.7.1	Синтаза жирных кислот.....	132
3.7.7.2	Фосфорилаза а.....	133
3.7.7.3	Гексокиназа.....	135
3.7.7.4	Пируваткиназа.....	136
3.7.7.5	Ацетаткиназа.....	137
3.7.7.6	3-Фосфоглицераткиназа.....	138
3.7.8	Гидролазы.....	139
3.7.8.1	Липаза.....	139
3.7.8.2	Холинэстераза.....	142
3.7.8.3	Ацетилхолинэстераза.....	143
3.7.8.4	Щелочная фосфатаза.....	144
3.7.8.5	Кислая фосфатаза.....	146
3.7.8.6	Рибонуклеаза (панкреатическая).....	147
3.7.8.7	а-Амилаза.....	147

	3.7.8.8	<u>Глюкоамилаза</u>	149
	3.7.8.9	<u>Лизоцим</u>	150
	3.7.8.10	<u>α-Глюкозидаза</u>	150
	3.7.8.11	<u>(З-Галактозидаза</u>	152
	3.7.8.12	<u>Р-Фруктозидаза</u>	153
3.7.9		<u>Протеазы</u>	154
	3.7.9.1	<u>Метод Ансона</u>	154
	3.7.9.2	<u>Расщепление казеина</u>	157
	3.7.9.3	<u>Расщепление азоказеина</u>	158
	3.7.9.4	<u>Нингидриновый метод</u>	158
	3.7.9.5	<u>Лейцинаминопептидаза</u>	160
	3.7.9.6	<u>Химотрипсин</u>	161
	3.7.9.7	<u>Пепсин</u>	162
	3.7.9.8	<u>Трипсин</u>	163
	3.7.9.9	<u>Аспарагиназа</u>	163
	3.7.9.10	<u>Уреаза</u>	164
	3.7.9.11	<u>Аденозинтрифосфатаза</u>	166
3.7.10		<u>Лиазы</u>	167
	3.7.10.1	<u>Пируватдекарбоксилаза</u>	167
	3.7.10.2	<u>Альдолаза</u>	168
	3.7.10.3	<u>Антракилатсинтаза</u>	169
	3.7.10.4	<u>Карбоангидраза</u>	170
	3.7.10.5	<u>Фумараза</u>	171
3.7.11		<u>Изомеразы</u>	171
	3.7.11.1	<u>Ксилозоизомераза (глюкозоизомераза)</u>	171
3.7.12		<u>Определение концентрации никотинамидных нуклеотидов с помощью сопряженных ферментативных реакций</u>	175
	3.7.12.1	<u>Определение концентрации НАДФ(Н)</u>	175
	3.7.12.2	<u>Определение концентрации НАД(Н)</u>	177
3.8		<u>Различные методы</u>	179
3.8.1		<u>Определение концентрации белков</u>	179
	3.8.1.1	<u>Биуретовая реакция</u>	179
	3.8.1.2	<u>Определение концентрации белков с помощью бицинониновой кислоты</u>	180
	3.8.1.3	<u>Метод Лоури</u>	182
	3.8.1.4	<u>Определение концентрации белка с помощью Кумасси (метод Брэдфорд)</u>	183
	3.8.1.5	<u>Определение концентрации белка по поглощению раствора</u>	184
	3.8.1.6	<u>Флуоресцентный анализ</u>	187
	3.8.1.7	<u>Нингидриновый метод</u>	190
	3.8.1.8	<u>Модифицированный нингидриновый метод без гидролиза образца</u>	191
	3.8.1.9	<u>Определение концентрации белков с помощью 2-нафтол-1-карбокисаальдегида</u>	193
3.8.2		<u>Определение концентрации фосфата</u>	194
3.8.3		<u>Концентрирование растворов ферментов</u>	195
	3.8.3.1	<u>Преципитация</u>	195
	3.8.3.2	<u>Ультрафильтрация и диализ</u>	199
	3.8.3.3	<u>Ультрацентрифугирование</u>	201
	3.8.3.4	<u>Лиофилизация</u>	201
	3.8.3.5	<u>Некоторые другие методы</u>	202
3.9		<u>Иммуноферментный анализ</u>	203
	3.9.1	<u>Неконкурентный твердофазный иммуноферментный анализ</u>	204

3.9.2	Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ.....	205
3.9.3	Методы иммуноферментного анализа и способы иммобилизации.....	206
3.9.3.1	Связывание белков с агарозой, активированной бромцианом.....	206
3.9.3.2	Присоединение диаминогексана.....	207
3.9.3.3	Активация целлюлозы перйодатом.....	208
3.9.3.4	Получение конъюгата белков (антител) с ферментами (пероксидазой).....	209
3.9.3.5	Введение тиогрупп в молекулы антител или белков.....	209
3.9.3.6	Конъюгация р-галактозидазы с антителами с помощью сложного эфира 3-maleимидобензоил-И-гидроксисукцинимид. .	210
3.9.3.7	Конъюгация щелочной фосфатазы с антителами с помощью глутарового альдегида.....	211
3.9.3.8	Перекрестное сшивание белков с помощью диметилсуберимидата.....	212
4	Изучение связывания	213
4.1	Необратимое, обратимое, специфическое и неспецифическое связывание.....	213
4.1.1	Общие замечания.....	213
4.1.2	Экспериментальные аспекты.....	216
4.1.2.1	Количество фермента или макромолекулы.....	217
4.1.2.2	Стабильность фермента или макромолекулы . .	217
4.1.2.3	Стабильность лиганда.....	218
4.1.2.4	Концентрация компонентов.....	219
4.2	Анализ связывания с помощью определения размеров частиц . .	219
4.2.1	Ультрафильтрация.....	220
4.2.2	Равновесный диализ.....	221
4.2.2.1	Связывание индола с бычьим сывороточным альбумином.....	223
4.2.3	Обработка результатов эксперимента по изучению связывания.....	227
4.2.4	Гель-фильтрация.....	230
4.2.5	Ультрацентрифугирование.....	232
4.3	Спектральные методы.....	234
4.3.1	Дифференциальная спектроскопия.....	235
4.3.1.1	Применение метода дифференциальной спектроскопии для анализа связывания лигацдов с каталазой.....	239
4.3.1.2	Анализ кривой связывания, полученной спектральным методом.....	245
4.3.2	Флуоресцентная спектроскопия.....	247
4.3.2.1	Связывание А НС с бычьим сывороточным альбумином.....	250
4.4	Другие методы анализа связывания.....	255
4.4.1	Радиоактивная метка.....	255
4.4.2	Отражательная интерференционная спектроскопия.....	256
5	Применение ферментов в технологических процессах	257
5.1	Принципы иммобилизации ферментов.....	258
5.1.1	Адсорбция.....	259

5.1.2	Включение в пористую матрицу.....	260
5.1.3	Капсулирование.....	261
5.1.4	Образование перекрестных сшивок.....	262
5.1.5	Ковалентное связывание на твердом носителе.....	264
	5.1.5.1 Носители.....	264
	5.1.5.2 Спейсер.....	265
5.2	Методы иммобилизации ферментов.....	266
5.2.1	Микрокапсулирование в нейлоновые шарики.....	267
5.2.2	Включение в полиакриламидный гель.....	267
5.2.3	Ковалентная иммобилизация фермента на поверхности непористого стекла.....	269
5.2.4	Иммобилизация на стекле с контролируемым размером пор.....	272
5.2.5	Ковалентная иммобилизация на полиамидной матрице.....	274
5.2.6	О-Алкилирование с помощью тетрафторбората триэтилоксония.....	275
5.2.7	Связывание фермента с аминогруппами после частичного гидролиза полиамида.....	278
5.2.8	Связывание фермента с карбоксильными группами после частичного гидролиза полиамида.....	281
5.2.9	Иммобилизация фермента на полиэфирной матрице. . . .	281
5.2.10	Иммобилизация с помощью щелочного гидролиза и активации тозилхлоридом.....	284
5.2.11	Щелочной гидролиз и активация карбонилдидимидазолом.....	285
5.3	Методы анализа иммобилизованных ферментов.....	286
5.3.1	Определение концентрации белка.....	286
5.3.2	Определение ферментативной активности.....	287
	5.3.2.1 Модификация оптических методов анализа для определения активности иммобилизованных ферментов.....	287
	5.3.2.2 Кофакторы в реакциях с иммобилизованными ферментами.....	289
5.4	Биореакторы.....	290
5.4.1	Реактор периодического действия.....	292
5.4.2	Мембранный реактор.....	292
5.4.3	Реактор с неподвижным слоем.....	293
5.4.4	Иммобилизованные клетки.....	294
5.5	Биосенсоры.....	294
5.5.1	Ферментные электроды.....	294
5.5.2	Иммунные сенсоры.....	300
5.5.3	Другие типы биосенсоров.....	301
5.5.4	Биоаффинные сенсоры.....	302
5.6	Иммобилизованные ферменты в медицине.....	302
	Приложение .	304
	Список ферментов в соответствии с их международной классификацией (КФ)	304
	Предметный указатель	322

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Ферменты, или энзимы, — это белки, выполняющие функцию биологических катализаторов. Ферменты присутствуют во всех живых клетках и обеспечивают превращение одних веществ в другие. Они участвуют практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах, направляя и регулируя обмен веществ. Отличительной особенностью ферментов по сравнению с небелковыми катализаторами является их высокая специфичность: константа связывания некоторых субстратов с белком может достигать 10^{10} моль/л, а эффективность ферментов значительно превышает эффективность небелковых катализаторов.

О существовании ферментов ученые знают давно, уже более 100 лет, так что современная энзимология — наука о ферментах — весьма развитая научная и техническая дисциплина. Энзимология тесно связана с такими быстро развивающимися сегодня областями знания, как биохимия и медицина. Косвенным свидетельством перспективности энзимологии служит рост числа ферментов и ферментных препаратов, используемых в самых разных областях человеческой деятельности — от нефтехимической промышленности до производства лекарств. Возможно, интерес к энзимологии связан именно с необычайно широкими возможностями, открывающимися в связи с использованием ферментов в жизненно важных областях, в первую очередь в медицине. Поэтому не вызывает удивления рост числа учебных дисциплин и специализаций, включающих изучение и освоение тех или иных аспектов энзимологии, в вузах и других учебных учреждениях.

Энзимологии как научной дисциплине посвящено большое количество монографий, справочников, учебников и учебных пособий, различного рода методических разработок и руководств как в мировой, так и отечественной литературе. Чем же отличается от них предлагаемая читателю книга? Дело в том, что материал, который нашел отражение здесь, не совсем традиционен для такого рода литературы, поскольку учебники по энзимологии акцентируют внимание читателя природе ферментов, причинах, закономерностях и механизмах ферментативного катализа, кинетике и регуляции ферментативных реакций, получении ферментативных препаратов, возможностях их химической и/или генно-инженерной модификации, путях технологического использования. Короче говоря, «классический» учебник нацелен на формирование у читателя представлений и знаний о том, как устроен фермент и как, почему и где он работает. Однако за рамки такого учебника, как правило, полностью выносятся информация о том, а как же, собственно, работать с ферментами. В связи с этим многие практические вопросы энзимологии оказываются нераскрытыми и неясными не только для студентов, но порой возникают неожиданные методические и экспериментальные

затруднения даже у специалистов, которые обучались в свое время как раз по классическим учебникам.

Помочь научиться работать с ферментами и ферментативными системами — главная задача предлагаемой книги. Конечно, фундаментальные основы энзимологии нашли здесь достаточно полное отражение, хотя и без детализации. Самое же важное, что книга насыщена общими и конкретными экспериментальными методиками и практическими указаниями. Здесь изложены основные экспериментальные приемы работы с ферментами, начиная от методов выделения и очистки ферментов, кончая методами регистрации конкретных ферментативных реакций. Подробно изложены основы спектрометрических и электрохимических методов и их приложение к ферментам. Даны многочисленные примеры приготовления рабочих растворов и реакционных систем. Рассмотрены методы определения активности ферментов, относящихся к разным классам, причем все приведенные методики можно легко воспроизвести в лаборатории или в студенческом практикуме. Целая глава книги посвящена методам изучения связывания ферментов с лигандами. В связи с растущей биотехнологической значимостью энзимологии следует особо подчеркнуть, что немалое внимание уделено методам получения технологических препаратов ферментов, рассмотрены способы подготовки носителей для иммобилизации, сами методы иммобилизации и способы определения активности иммобилизованных ферментов. Имеются материалы по практическому использованию ферментов и ферментативного катализа, в том числе в иммуоферментном анализе, биосенсорах и биореакторах. В приложении в сокращенном варианте представлена современная классификация известных ферментов.

Широкий охват и глубокая проработка темы делают эту книгу действительно уникальной, имеющей несомненную ценность для достаточно широкой аудитории. Иными словами, перед вами не просто еще один учебник по энзимологии, который в любом случае оказался бы излишним и нашел свою аудиторию. У меня нет сомнений, что читательская аудитория данной книги окажется большой и даже очень большой. Книга может быть рекомендована в качестве учебного пособия для студентов и аспирантов медицинских, фармацевтических, биологических, химических и биотехнологических факультетов университетов и вузов, специализирующихся в области физико-химической, медицинской и инженерной энзимологии, а также как справочник для всех, кто работает в этих областях.

Л. В. Леваиов,
профессор кафедры химической энзимологии
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

ПРЕДИСЛОВИЕ

Ферментами¹ мы называем органические вещества в живых организмах, которые в определенных условиях способны ускорить достижение равновесия реакций между органическими веществами растительного и животного происхождения. При ферментизации эти органические вещества, входя в контакт с ферментами, испытывают определенные изменения, в результате чего образуются молекулы с более низкой теплотой сгорания, распад которых происходит уже без участия ферментов обычным химическим путем.

Е.Ф. ф. Горуп-Безанец «Учебник по физиологической химии», 1878,
[E.F. v. Gorup-Besanez (1878) Lehrbuch der Physiologischen Chemie,
4th ed., Vieweg, Braunschweig]

Существует множество прекрасных учебников по биохимии, посвященных в частности методам выделения, структуре, механизму катализа и кинетическим закономерностям действия ферментов. Однако лишь в немногих книгах доходчиво изложена суть ферментативного анализа и возможности его практического применения. Это объясняется огромным количеством научных результатов, которые невозможно свести в одну-единственную книгу. На самом деле все труды в области энзимологии либо разрастаются до гигантских размеров, как *Methods in Enzymology*, либо просто прерываются при достижении определенного объема, как классические труды *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. H. U. Bergmeyer) или *The Enzymes* (Academic Press, San Diego). Подобная ситуация, естественно, не может удовлетворять исследователя, работающего в клинической или аналитической лаборатории, которому методики эксперимента необходимо иметь прямо на рабочем столе и для которого понятная книга, ограниченная определенным набором методов и не претендующая на полноту охвата основ биохимии, может оказаться гораздо полезней, чем масса литературы, имеющейся в библиотеке. Исходя из вышесказанного, в данной книге основное внимание уделено ферментативному анализу в его узком Понимании, а также изучению связывания лигандов и эффекторов. В книге излагаются основные теоретические принципы и экспериментальные методы, а также общие правила работы с ферментами и различные аспекты их технологического применения. Для сокращения объема книги препаративные процедуры и методы, используемые при решении более широкого круга проблем, такие как электрофорез, здесь не рассматриваются.

Основной целью автора было помочь читателю понять основы соответствующих методов. Поскольку невозможно отдельно описать каждый фермент и условия реакции в каждой ферментативной системе, мою

¹ В английской и немецкой литературе используют термин «энзим».

книгу можно рассматривать как справочник, помогающий адаптировать соответствующую методику к конкретным условиям или создать специфический тест. Таким образом, здесь рассматриваются не только наиболее распространенные, но и довольно специфические методы исследования. Для иллюстрации конкретных методов, таких как фотометрическое титрование или равновесный диализ, обычно приводится лишь одна или несколько типичных методик. Эти методики можно либо воспроизвести непосредственно в том виде, в котором они представлены в книге, что позволит исследователю ознакомиться с методом, либо использовать в качестве руководства при разработке методики анализа для какой-либо иной системы. Приведенные примеры можно использовать для студенческих практикумов, так как они обеспечивают достаточный уровень аналитического сигнала и могут быть выполнены на приборах с не самым высоким уровнем чувствительности.

Необходимо подчеркнуть неоценимый вклад, который внесли Райнер Фигура, д-р Клаус Мошель и д-р Мериам Нойами-Бахманн в написание главы, посвященной иммобилизации ферментов. Автор также чрезвычайно признателен д-ру Комфурту У. Иньянгу за лингвистические исправления.

Ханс Биссвангер
Тюбинген, апрель 2004

СОКРАЩЕНИЯ

ϵ	Коэффициент поглощения
A	Поглощение света
A, B, C	Специфические лиганды (например, субстраты)
BApNA	Ы-Бензоил-Ы-аргинин-л-нитроанилид
BСА	Бицинхониновая кислота
E	Фермент
E	Электродвижущая сила
E1o	а-Оксоглутарат дегидрогеназа в ОГДГК
E1p	Пируватдегидрогеназа в ПДГК
E2o	Дигидролипоамид-сукцинилтрансфераза в ОГДГК
E2p	Дигидролипоамид-ацетилтрансфераза в ПДГК
E3p, E3o	Дигидролипоамид-дегидрогеназа в ПДГК и ОГДГК
ELISA	Твердофазный иммуноферментный анализ
F	Константа Фарадея
GLUPHEPA	N- Глугарил - L-фенилаланин-л-нитроанилид
h	Постоянная Планка
I	Интенсивность света
k	Константа скорости
k_{cat}	Каталитическая константа
K_d	Константа диссоциации
K_M	Константа Михаэлиса
M_r	Относительная молекулярная масса
P, Q, R	Продукты реакции
PMSF	Фенилметилсульфонилфторид
PN	Продуктивность микроорганизмов
R	Универсальная газовая постоянная
S	Субстрат
SMCC	(4-(>)-малеимидометил)циклогексан-1 -карбоновой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир
SUPHEPA	M-Сукцинил-Ы-фе нил аланин-л-нитроанилид
TES	Л-Трис[гидроксиметил]метил-2-аминометан-сульфо новая кислота
TLCK	Ы-1-Хлор-3-(4-тозиламидо)-7-амино-2-гептанон
TPCK	L-1 -Хлор-3-(4-тозиламидо)-4-фенил-2-бутанон
V_{max}	Максимальная скорость
АБТС	2,2-Азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфовая кислота
АДГ	Алкогол ьдегидрогеназа

АНС	1-Анилинонафталин-8-сульфонат
АсАТ	Аспаратаминотрансфераза
БСА	Бычий сывороточный альбумин
Г6ФДГ	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГАФДГ	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
ГДГ	Глутаматдегидрогеназа
ГО	Глюкозооксидаза
ДМСО	Диметилсульфоксид
ДТТ	1,4-Дитио-Б-трейтол (реагент Келланда)
ДХФИФ	2,6-Дихлорфенолиндофенол
ИФА	Иммуноферментный анализ
КДИ	Карбонилдиимидазол
КоА	Кофермент А
ЛАП	Лейцинаминопептидаза
ЛДГ	Лактатдегидрогеназа
МБС	3-Малеимидобензоил-Ы-гидроксисукцинимид
МДГ	Малатдегидрогеназа
МЕ	Международные единицы (ферментативной активности)
НАД	Никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ОГДГК	α -Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс
о-НФГ	о-Нитрофенил-(3-Б-галактопиранозид
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПДГК	Пируватдегидрогеназный комплекс
ПК	Пируваткиназа
ПО	Пероксид азота
РИА	Радиоиммуноанализ
ТДФ	Тиаминдифосфат
Трис	Трис(гидроксиметил)аминометан
ТХУ	Трихлоруксусная кислота
ФГК	3-Фосфоглицераткиназа
ФМН	Флавинмононуклеотид
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ФТА	Фосфотрансацетилаза
ЦС	Цитратсинтаза
ЭГТА	Этиленгликоль-бис-(3-аминоэтилэфир)-М,1Ч[,]Ч[,]Ч[-тетраацетат
ЭДТА	Этилендиаминтетраацетат

* | ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день описано свыше 3000 различных ферментов, а по оценкам, в природе их существует около 25 000, однако в настоящее время не более десятой части описанных ферментов поступают в продажу. Ферменты — чрезвычайно эффективные катализаторы, и большинство катализируемых ими реакций не могли бы протекать без их участия, во всяком случае, за какое-то разумное время. Ферменты ускоряют спонтанные реакции в 10^8 - 10^{10} раз, а иногда и в 10^{12} раз (Menger, 1993). Приведем пару удивительных примеров: оротидин-5'-фосфат—декарбоксилаза в 10^{17} раз ускоряет реакцию, которая без ее участия протекает с периодом полуреакции 78 миллионов лет (Radzicka & Wolfenden, 1995). Триозофосфат-изомераза более чем в 10^9 раз ускоряет переход дигидроксиацетон-фосфата в енольную форму (Alberty & Knowles, 1976).

Конечно, некоторые реакции могут протекать спонтанно, например реакция образования воды из водорода и кислорода в дыхательной цепи (хотя высвобождающееся в этой спонтанной реакции значительное количество тепла просто теряется). Тем не менее даже такие реакции протекают с участием ферментов, и каждая реакционная стадия метаболизма контролируется определенным ферментом. Таким образом, ферменты выполняют более обширную и более важную функцию, чем простое ускорение определенных процессов. Преимущество ферментативных реакций состоит не только в том, что они быстрее достигают равновесия, но также в том, что их можно контролировать путем добавления или удаления определенного количества катализатора. Кроме того, эффективность ферментов как катализаторов может регулироваться извне как положительным, так и отрицательным образом под действием активаторов или ингибиторов без изменения количества фермента в системе. Таким образом, клеточные процессы подвержены строго координированной регуляции, без которой невозможно было бы существования самой жизни. Итак, наиболее важной функцией ферментов можно считать регуляцию метаболизма клетки.

Белковая природа фермента идеально подходит для выполнения этой двойственной функции. Во-первых, функциональные группы аминокислотных остатков белка способны формировать специфические участки связывания и каталитические центры, во-

вторых, белки обладают достаточной гибкостью для того, чтобы способствовать образованию и стабилизации переходных состояний и индуцировать конформационные изменения, влияющие на эффективность катализа. Двадцати основных аминокислот с их гидрофильными, гидрофобными, кислыми и основными группами вполне достаточно для образования специфических участков связывания субстратов и регуляторных молекул и для реализации каталитической функции. Однако иногда, особенно для выполнения последней функции, необходимо участие веществ небелковой природы, таких как коферменты (специфические факторы, способные диссоциировать из комплекса с белком) и простетические группы (не способны диссоциировать). В качестве примеров коферментов можно назвать НАД(Ф), тиаминдифосфат и кофермент А, а в качестве примеров прочно связанных простетических групп — ФАД, цитохромы, порфирины, пиридоксамин, липоевую кислоту, биотин и тетрагидрофолиевую кислоту. Многим ферментам для выполнения своей функции и для сохранения структуры необходимы ионы металлов. Ионы Mg^{2+} способствуют связыванию фосфатных групп АДФ, АТФ и тиаминдифосфата с ферментами, а ионы железа (в цитохромах), кобальта (в корриновой системе колец), меди (в цитохромоксидазе, тирозиназе и др.), цинка (в карбоангидразе и алкогольдегидрогеназе), молибдена (в нитрогеназе), марганца (в аргиназе и ксилозо(глюкозо)изомеразе) и селена (в глутатионпероксидазе) необходимы для катализа.

Белковая природа ферментов помогает им адаптироваться к взаимодействию с любым необходимым лигандом в результате мутаций. Это свойство очень широко применяется в биотехнологии: методы направленного мутагенеза позволяют изменять специфичность и функции ферментов. Молекулярное моделирование (так называемый белковый дизайн) позволяет прежде смоделировать определенные модификации, а затем реализовать их путем введения соответствующих мутаций. Примером может служить гидроксиизокапроатдегидрогеназа, катализирующая восстановительное превращение α -кетокислоты в хиральную молекулу гидроксикарбоновой кислоты — гидроксипропаной кислоты. Лучшим субстратом для данного фермента является α -кетокислота — α -кетокислота — подвергается превращению с гораздо меньшей эффективностью. Методом направленного мутагенеза каталитическая эффективность фермента по отношению к данному субстрату (k_{cat}/K_M) была повышена на четыре порядка, а по отношению к физиологическому субстрату — на два порядка по сравнению с физиологическим субстратом (Feil et al., 1994).

С другой стороны, белковая природа ферментов делает их чрезвычайно чувствительными к влиянию окружающей среды — значению pH, ионной силы, температуры, — в результате чего максимальная активность реализуется лишь в строго определенных условиях. В клетках живого организма условия поддерживаются в оптимальном диапазоне (это не всегда так в отношении температуры, особенно в случае клеток микроорганизмов). Однако существуют ферменты, демонстрирующие неожиданную стабильность даже при экстремальных условиях. Хотя обычно считают, что ферменты весьма чувствительны к повышению температуры, ферменты из таких бактерий, как *Thermus*, *Thermotoga*, *Thermoplasma* переносят температуру до 100 °С. В процессе эволюции на Земле температура постепенно снижалась, поэтому очевидно, что более древние организмы и их структуры переносили гораздо более высокие температуры, чем современные организмы. Отсюда следует вывод, что все предшественники существующих сегодня ферментов были термостабильными, но утратили это свойство в связи со снижением температуры окружающей среды. Этим можно объяснить тот факт, что природа «выбрала» в качестве биокатализаторов именно белки, а не более стабильные нуклеиновые кислоты, хотя некоторые виды РНК также обладают каталитической активностью.

В данной книге мы рассмотрим некоторое количество ферментативных реакций и связанных с ними аналитических методов, в частности определение белка, причем особый акцент делается на иммобилизованные ферменты. Мы остановимся на наиболее часто используемых методах ферментативного анализа и поговорим о различных типах ферментов и методов, а также приведем несколько специфических тестов. Понятно, что такая большая тема не может быть полностью изложена в столь ограниченном объеме, так что выбор ферментов или методов иногда может показаться произвольным. Для получения более полной информации следует обращаться к учебникам и серийным изданиям по энзимологии.

Литература

- Alberty, W.J., Knowles, J.R. (1976) *Biochemistry* 15, 5631-5640
Feil, I.K., Lerch, H.P., Schomburg, D. (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 857-863
Menger, F.M. (1993) *Acc. Chem. Res.* 26, 206-212
Radzicka, A., Wolfenden, R. (1995) *Science* 267, 90-93

Учебники и серийные издания

- Advances in Enzymology*, Wiley, New York
Bergmeyer, H.U. (ed.) (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. Verlag Chemie, Weinheim
Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego
Schomburg, D., ed. (2001f) *Springer Handbook of Enzymes*. Springer, Berlin
The Enzymes, Academic Press, San Diego

2 НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Ферменты обычно имеют тривиальные названия, часто возникающие исторически и никак не связанные с их каталитической функцией, например, диафораза (дигидролипоамид дегидрогеназа) или старый желтый фермент (НАДФН:(акцептор) оксидоредуктаза). Иногда тривиальное название дает некоторую информацию о реакции, но не ее систематическое описание, например, тривиальное название фермента L-лактатдегидрогеназа говорит об окислении гидроксильной группы лактата до оксогруппы, но ничего не сообщает об акцепторе, как это делает систематическое название (B)-лактат:НАД⁺ оксидоредуктаза. Однако систематические названия настолько неудобны для постоянного употребления, что общепринятыми являются тривиальные названия, даже в официальном языке, например в торговых операциях. Номенклатура ферментов рекомендует использовать особое тривиальное название (рекомендованное название) для каждого фермента.

Для точного обозначения каждого отдельного фермента и для четкого разграничения между огромным числом близких по своей сути ферментативных реакций Международный биохимический союз (IUB) в 1956 г. учредил Международную комиссию по ферментам, которую возглавил профессор М. Флоркин. Комиссия разработала классификацию и номенклатуру для всех известных ферментов. В 1961 г. комиссия была заменена Постоянным комитетом по ферментам, а в 1969 г. — Экспертным комитетом по ферментам, который до настоящего времени ведет работу по обновлению Номенклатуры ферментов (см. список литературы) и регулярно публикует дополнения в *European Journal of Biochemistry*. На сегодняшний день в списке насчитывается свыше 3000 ферментов. В списке фигурирует также цифровой код и систематическое название каждого фермента.

Названия ферментов (в том числе и тривиальные) подчиняются общим правилам. Обычно название имеет окончание «аза» и указывает на некие свойства катализируемой реакции (репаза, каспаза). Если фермент катализирует несколько реакций (например, если он состоит из нескольких субъединиц, катализирующих несколько последовательных реакций), его следует

называть *системой*, хотя часто подобные структуры называют *комплексами*, например пируватдегидрогеназная система (комплекс), система (комплекс) синтазы жирных кислот. Поскольку название фермента основано на катализируемой им реакции, ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию (ферменты из разных организмов или изоферменты), имеют один и тот же код и одно и то же систематическое название. Из этого правила есть несколько исключений, например кислая и щелочная фосфатазы или ацетилхолинэстераза и холинэстераза. Не имеющие каталитической функции белки не вносятся в список ферментов.

Для классификации фермента в соответствии с катализируемой им реакцией следует указать направление этой реакции. Внутри каждого класса ферментов направление всех реакций должно быть одинаковым, даже если в физиологических условиях реакция протекает в другом направлении. Систематическое название исходит из принятой формы записи реакции, в то время как тривиальное (рекомендованное) название чаще всего связано с тем направлением реакции, которое было продемонстрировано. Систематическое название состоит из двух частей: в первой части указывают субстрат (субстраты), затем ставят двоеточие и обозначают суть реакции, оканчивая слово на «аза», например, алкоголь:НАД⁺ оксидоредуктаза. Систематические названия оксидоредуктаз следуют общей форме записи донор:(акцептор) оксидоредуктаза. В тривиальных названиях ферментов, катализирующих реакции с присоединением молекулярного кислорода, используется термин оксигеназа: монооксигеназа — если присоединяется один атом кислорода и диоксигеназа — если присоединяются оба атома. Если не возникает путаницы, то в тривиальных названиях опускают букву D для D-сахаров и L для L-аминокислот. Субстраты в анионной форме имеют окончание «ат» (малатдегидрогеназа). Если сразу за названием субстрата следует окончание «аза», значит, речь идет о его гидролизе (например, лактаза). Из общего правила заканчивать названия ферментов на «аза» существует несколько исключений, касающихся протеолитических ферментов, например пепсин, трипсин и др.

Цифровые коды классификации ферментов (КФ или ЕС коды — от англ. Enzyme Commission) состоят из четырех чисел, разделенных точками (например, КФ 3.2.1.4). Первая цифра указывает на принадлежность фермента к одному из шести основных классов:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы

3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы (синтетазы)

Следующие два числа обозначают подклассы и подподклассы ферментов, а последнее число — это серийный номер данного фермента в его подподклассе.

В приложении в конце данной книги приведен список, содержащий классы, подклассы и подподклассы ферментов, а также некоторые характерные примеры отдельных ферментов с указанием их рекомендованных тривиальных и систематических названий (для пептидаз (КФ 3.4) систематические названия не приведены). Для некоторых ферментов, кроме того, перечислены другие часто употребляемые тривиальные названия. С полным списком ферментов можно ознакомиться в соответствующих изданиях (см. список литературы).

Литература

- Enzyme nomenclature (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429, 1-45
Номенклатура ферментов (Рекомендации 1972), пер. с англ., М., 1979
Schomburg, D., Salzmann, M. (1990) *Enzyme Handbook*, Springer Verlag, Berlin
Webb, E.C., ed. (1992) *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego

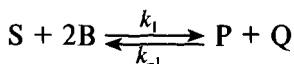
3 ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

3.1 ТЕОРИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Хотя ферментативные реакции подчиняются общим для всех химических реакций правилам, обычно их трактуют особым образом. Явной отличительной особенностью ферментативных реакций является то, что ферменты представляют собой чрезвычайно эффективные катализаторы. В связи с этим они очень сильно ускоряют химические реакции, но, как следует из законов термодинамики, ускорить можно лишь наступление состояния равновесия, а не общий ход реакции. Точно так же, как и все другие катализаторы, после осуществления реакции фермент остается в неизменном виде. Однако природная чувствительность ферментов как высокоорганизованных белков определяет условия протекания реакции, которые должны строго соблюдаться.

3.1.1 Порядок реакции

Прежде всего обратимся к определению порядка реакции. Порядком реакции называют степень, в которой концентрация данного компонента входит в уравнение реакции. Запишем реакцию в общем виде:



Для этой реакции в соответствии с законом действующих масс

$$K_d = \frac{[P][Q]}{[S][B]^2} \quad \text{O)}$$

Таким образом, данная реакция является реакцией первого порядка для всех компонентов, за исключением B, для которого она представляет собой реакцию второго порядка. При изучении реакции всегда важно знать ее порядок. Далее мы рассмотрим правила определения порядка реакции.

3.1.1.1 РЕАКЦИИ НУЛЕВОГО ПОРЯДКА

Хотя концепция реакций нулевого порядка кажется несколько противоречивой, поскольку скорость такой реакции вовсе не

зависит от концентрации реагирующих веществ, для ферментативных реакций этот случай очень важен, как мы покажем далее. На самом деле, специфической особенностью ферментативной реакции является ограничение скорости реакции концентрацией самого катализатора. Только количество фермента определяет скорость реакции, а никакие изменения концентраций реагирующих веществ не имеют значения, так что реакция протекает с постоянной скоростью v :

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k \quad (2)$$

Концентрация катализатора не должна изменяться в процессе реакции, так что ее считают константой. Интегрирование уравнения по времени t приводит к линейной зависимости концентрации субстрата (и образования продукта) от времени:

$$\begin{aligned} [S] &= [S]_0 - kt \\ [P] &= [P]_\infty + kt \end{aligned} \quad (3)$$

Такую линейную зависимость, которая является четким индикатором реакции нулевого порядка, легко можно наблюдать на кинетической кривой (рис. 3.1).

3.1.1.2 РЕАКЦИИ ПЕРВОГО ПОРЯДКА

Реакция, скорость которой зависит от концентрации одного реагирующего вещества, является реакцией первого порядка.

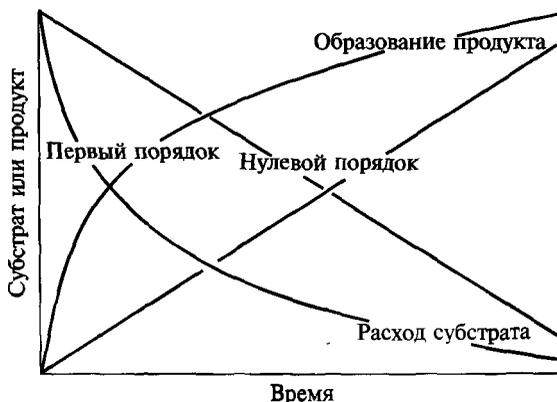


Рис. 3.1. Кинетическая кривая, описывающая конверсию субстрата и образование продукта в реакциях нулевого и первого порядков

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[S] \quad (4)$$

Реакции первого порядка в чистом виде встречаются довольно редко, поскольку они описывают превращения одного вещества, как при радиоактивном распаде. Такие процессы обычно протекают спонтанно и их довольно трудно контролировать. Интегрирование по времени приводит к экспоненциальной зависимости концентрации вещества от времени:

$$[S] = [S]_0 e^{-k_1 t} \quad (5)$$

Такой тип зависимости легко отличить от линейной зависимости, характерной для реакции нулевого порядка (рис. 3.1). Сложности могут возникнуть с распознаванием реакций более высокого порядка. Для этого уравнение следует привести к линейному логарифмическому виду:

$$\ln [S] = \ln [S]_0 - k_1 t \quad (6)$$

Далее строят график, откладывая значения $\ln [S]$ по оси ординат, а значения времени t — по оси абсцисс. Из угла наклона полученной кривой можно определить константу скорости первого порядка k_1 измеряемую с^{-1} .

3.1.1.3 РЕАКЦИИ ВТОРОГО И БОЛЕЕ ВЫСОКОГО ПОРЯДКОВ

Большинство известных реакций имеют второй или более высокий порядок. В полулогарифмических координатах эти реакции можно отличить от реакций первого порядка по отклонению от линейной зависимости, однако обрабатывать полученные данные сложнее, поскольку в данном случае имеет место зависимость от концентрации нескольких реагирующих веществ:

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{-d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[S][B] \quad (7)$$

$$k_1 t = \frac{1}{[S]_0 - [B]_0} \ln \frac{[B]_0 [S]}{[S]_0 [B]} \quad (8)$$

Данное уравнение можно свести к уравнению реакции первого порядка (т.е. к зависимости лишь от одной переменной) в том случае, если одно из реагирующих веществ присутствует в столь высокой концентрации, что ее изменениями в процессе реакции можно пренебречь (реакция псевдопервого порядка):

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[S][B]_0 = k_1'[S] \quad (4a)$$

где $k_x' = fcJB\text{Jo}$.

При таких условиях зависимость концентрации реагирующего вещества от времени для реакции второго порядка также может быть линеаризована:

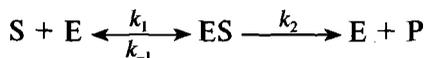
$$\ln [S] = \ln [S]_0 - k_1' t \quad (6a)$$

Константу скорости реакции второго порядка $k_1' = A:JB]_0$, имеющую размерность $\text{с}^{-1}\text{M}^{-1}$, можно определить из угла наклона кривой в координатах $\ln [S]$ от t . Поскольку и реакция первого порядка, и реакция псевдопервого порядка дают линейные зависимости в полулогарифмических координатах, их нельзя различить только на основании подобных графиков. Однако поскольку в последнем случае концентрация второго реагирующего вещества влияет на угол наклона, варьируя его концентрацию, можно получать графики с другим углом наклона, чего не должно наблюдаться в случае реакции истинно первого порядка.

Реакции третьего и более высокого порядка не линеаризуются в полулогарифмических координатах, если лишь одно из реагирующих веществ находится в избытке, но приводятся к реакции псевдопервого порядка, если в избытке присутствуют все реагирующие вещества, за исключением одного, концентрация которого является переменной.

3.2 УРАВНЕНИЕ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН

Уравнение, названное в честь немецких ученых Л. Михаэлиса и М. Ментен [1], было выведено в 1902 г. А. Брауном [2] и В. Анри [3]. В своей окончательной версии оно основано на предположении Г.Е. Бриггса и Дж.Б.С. Холдейна [4] о стационарном состоянии, выдвинутом в 1925 г. В простейшем виде уравнение реакции необратимого превращения единственного субстрата (S) в продукт реакции (P) под действием фермента (E) выглядит следующим образом:



Составим дифференциальные уравнения для всех участников процесса.

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (9a)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (96)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (9B)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad (9Г)$$

Из этих соотношений нельзя вывести простое уравнение для скорости реакции, поэтому пришлось прибегнуть к ряду допущений. Они основаны на предположении о том, что равновесие на первой стадии реакции достигается быстрее, чем протекает следующая стадия образования продукта, так что константы скоростей реакций связаны между собой следующим соотношением: $k_x \ll k_{-y} > k_2$. Исходно считалось, что каталитическая константа k' должна быть настолько малой, чтобы никак не влиять на равновесную стадию реакции. Однако поскольку скорость реакции напрямую зависит от концентрации комплекса ES ($v = A \wedge [ES]$), она является мерой концентрации этого комплекса и, следовательно, может быть использована для определения константы диссоциации комплекса в соответствии с законом действующих масс:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[S][E]}{[ES]}$$

Позднее Бриггс и Холдейн поняли, что полностью пренебречь константой k_2 нельзя; образование (с константой k_x) и распад (с константами k_1 и k_2) фермент-субстратного комплекса ES должны компенсировать друг друга, так чтобы $[ES]$ оставалась постоянной: $d[ES]/cfr = 0$. Это состояние, реализующееся лишь на протяжении ограниченного времени, было названо стационарным состоянием, чтобы отличать его от реального равновесия. Для этого периода времени уравнение общей скорости реакции можно упростить: упростим дифференциальное уравнение для фермент-субстратного комплекса (9B).

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

Учитывая, что общее количество фермента в реакционной смеси состоит из свободного и связанного в комплекс фермента, т.е. $[E]_0 = [E] + [ES]$, данное уравнение можно представить в ином виде:

$$[\text{ES}] = \frac{k_1[\text{S}][\text{E}]_0}{k_1[\text{S}] + (k_{-1} + k_2)} \quad (10)$$

и подставить в уравнение для скорости реакции, разделив числитель и знаменатель на k_1 .

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{ES}] = \frac{k_2[\text{S}][\text{E}]_0}{[\text{S}] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \quad (11)$$

Постоянный член в знаменателе, состоящий из трех констант скоростей, можно заменить одной константой, названной константой Михаэлиса: $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$. Поскольку в процессе реакции общее количество фермента должно оставаться постоянным, произведение константы скорости и начальной концентрации фермента также объединяют в одну константу — максимальную скорость реакции $V_{\max} = k_2[\text{E}]_0$, которая достигается при условии, что все молекулы фермента из реакционной среды участвуют в катализе.

$$v = \frac{V_{\max}[\text{S}]}{[\text{S}] + K_M} \quad (12)$$

Это и есть окончательная форма записи уравнения Михаэлиса-Ментен. В то время как каталитическая константа k_2 , обычно обозначаемая $k_{\text{см}}$, является характеристикой конкретного фермента, максимальная скорость зависит от количества и активности фермента в реакционной среде, так что значения максимальной скорости, полученные в разных экспериментах (особенно в разных лабораториях), сравнивать между собой сложно. Для точного определения максимальной скорости необходимо знать как молярную концентрацию, так и удельную активность фермента. Напротив, константа Михаэлиса не зависит от количества и активности фермента, и соответствующие значения можно определять в одинаковых экспериментальных условиях.

В отличие от константы диссоциации K_d , константа Михаэлиса K_M включает в себя еще и каталитическую константу k_2 . Следовательно, K_d и K_M приближаются друг к другу в том случае, когда k_2 является пренебрежимо малой по сравнению с k_{-1} и k_p , значительно различаются, если k_{-1} приближается по значению к k_2 , и k_p . Однако поскольку в большинстве случаев k_2 действительно довольно мала, вклад константы диссоциации в константу Михаэлиса превосходит вклад каталитической константы, так что в этих случаях константу Михаэлиса можно рассматривать как показатель сродства. Как и константа диссоциации, K_M имеет

размерность концентрации (М), каталитическая константа κ_2 (константа скорости реакции первого порядка) измеряется вс^{-1} , а максимальная скорость V_{max} — в единицах концентрации за единицу времени ($\text{М} \cdot \text{с}^{-1}$).

Прежде чем обратиться к экспериментальному применению уравнения Михаэлиса-Ментен, следует упомянуть о некоторых его особенностях. Прежде всего, уравнение справедливо только в условиях стационарного состояния. Это условие, при котором $d[\text{ES}]/dt = 0$, можно легко проверить экспериментально, поскольку в таких условиях реакция должна иметь нулевой порядок, $v = d[\text{P}]/dt = -d[\text{S}]/dt = \kappa_2[\text{ES}] = \text{константа}$. Кинетические кривые, описывающие расход субстрата или накопление продукта, должны быть линейными. Подробнее мы обсудим этот вопрос чуть ниже. Условия, соответствующие нулевому порядку реакции, могут достигаться лишь при лимитирующей концентрации фермента, так что условие стационарности выполняется при очень низкой концентрации фермента, т.е. при $[\text{E}]_0 \ll [\text{S}]_0$. Непосредственная зависимость скорости реакции от (постоянной) концентрации комплекса ES ($v = \kappa_2[\text{ES}]$) приводит к тому, что скорость реакции должна быть прямо пропорциональна концентрации фермента. Линейная зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента является надежным доказательством применимости уравнения Михаэлиса-Ментен и помогает обнаруживать наличие посторонних факторов, влияющих на условия эксперимента.

Для проверки применимости уравнения Михаэлиса-Ментен для конкретного фермента, а также для определения константы Михаэлиса и максимальной скорости необходимо определить скорость реакции при различных концентрациях субстрата. Текущее значение скорости определяют по углу наклона начального линейного участка кинетической кривой как $d[\text{P}]/dt$ или $-d[\text{S}]/dt$ (например, в М/с или мкМ/мин). Если откладывать на графике эти значения, полученные при разных начальных концентрациях субстрата, должна получаться гиперболическая кривая с насыщением (рис. 3.2). Значение скорости реакции выходит на плато при стремлении концентрации субстрата к бесконечности, поскольку при $[\text{S}] \gg K_m$ последней константой можно пренебречь, и уравнение Михаэлиса-Ментен приводится к виду $v = V_{max}$. В точке $[\text{S}] = K_m$ $v = (1/2)V_{max}$, т.е. при скорости реакции, равной половине максимальной скорости, концентрация субстрата равна K_m . Исходя из этого соотношения, для анализа кинетики Михаэлиса концентрацию субстрата необходимо выбирать вблизи значения

K_i (она должна отличаться от K_{bi} не более чем на один порядок величины в большую или меньшую сторону).

Обычно всю необходимую информацию можно извлечь из графика зависимости v от $[S]$ (рис. 3.2), однако иногда используют другие типы зависимостей. Например, линейная форма уравнения облегчает определение кинетических констант и, кроме того, позволяет избежать таких серьезных ловушек, как недооценка значения максимальной скорости при слишком низких концентрациях субстрата, далеких от насыщающих концентраций. К сожалению, часто забывают, что максимальная скорость достигается только при бесконечно большой концентрации субстрата. Поэтому даже при концентрации субстрата в десять раз превышающей K_m , значение максимальной скорости может быть занижено на 10% (табл. 3.1). Это важно, поскольку для кинетической характеристики ферментов, в частности их зависимости от pH и температуры, а также для хорошей воспроизводимости анализа необходимо достигать состояния насыщения, но часто в результате не критического подхода лишь небольшое превышение K_m принимают за насыщающее значение. Как видно из табл. 3.1, стократного превышения K_m достаточно, хотя даже при этом возможна ошибка порядка 1%. Однако во многих случаях использовать такие высокие концентрации не представляется возможным из-за плохой растворимости, сильного поглощения (как в случае НАД(Ф)) или ингибирования активности фермента.

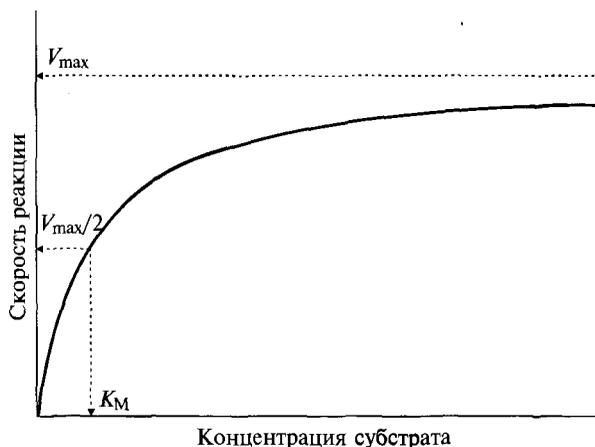


Рис. 3.2. Кривая с насыщением, описываемая уравнением Михаэлиса-Ментен.

Показан способ определения максимальной скорости и константы Михаэлиса K_M

Таблица 3.1. Заниженные значения максимальной скорости, определяемые при различных концентрациях субстрата, выраженных через константу Михаэлиса K_M

Избыток субстрата (число раз по отношению к K_M)	% v_{max}
0,5	33,3
1	50,0
2	66,7
4	80,0
5	83,3
8	88,9
10	90,9
15	93,8
20	95,2
25	96,2
30	96,8
40	97,6
50	98,0
60	98,4
80	98,8
100	99,0
1000	99,9
∞	100,0

Анализ уравнения в линейной форме позволяет не только однозначно определить кинетические константы, но и уловить отклонения от линейности, которые могут свидетельствовать об ином механизме реакции или об артефактах. Известны три типа линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен, впервые предложенные Вульфом в книге, изданной Холдейном и Стерном [5]:

двойные обратные координаты (или координаты Лайнуивера-Берка)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}[S]} \quad (13)$$

уравнение Иди-Хофсти

$$v = V_{max} - \frac{K_M v}{[S]} \quad (14)$$

уравнение Хайнса

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \quad (15)$$

Вид зависимостей в этих координатах и способы определения Констант показаны на рис. 3.3.

Следует сказать, что уравнение Михаэлиса-Ментен можно также проинтегрировать по времени. Уравнение в интегральном виде описывает ту самую кинетическую кривую, которую получают в эксперименте:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M} \quad (\text{Па})$$

$$K_M \ln \frac{[S]_0}{[S]} + [S]_0 - [S] = V_{\max} t \quad (16)$$

После интегрирования уравнение также поддается линеаризации, в результате чего кинетическая кривая преобразуется к линейному виду, из которого легко определить константы:

$$\frac{[S]_0 - [S]}{t} = V_{\max} - K_M \frac{\ln [S]_0/[S]}{t} \quad (17)$$

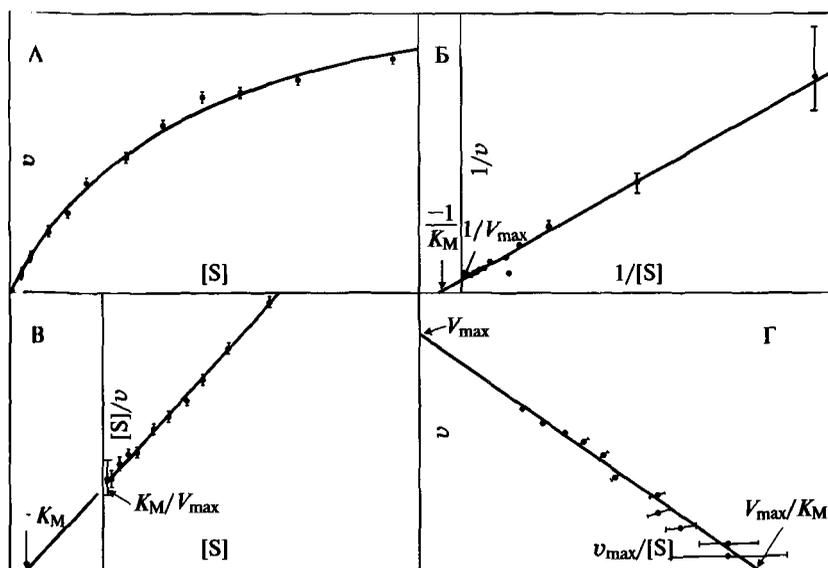


Рис. 3.3. Варианты представления полной кинетической кривой, описываемой уравнением Михаэлиса-Ментен: А — полная кинетическая кривая, Б — координаты Лайнуивера-Берка, В — координаты Хайнса, Г — координаты Иди-Хофсти. В каждом случае показана величина ошибки определения

Очевидное преимущество подобной процедуры состоит в том, что вся необходимая информация может быть получена из одного-единственного эксперимента, в отличие от описанного выше метода определения начальных скоростей, в котором необходимо произвести несколько измерений с различными начальными концентрациями субстрата. Кроме того, если кинетическая

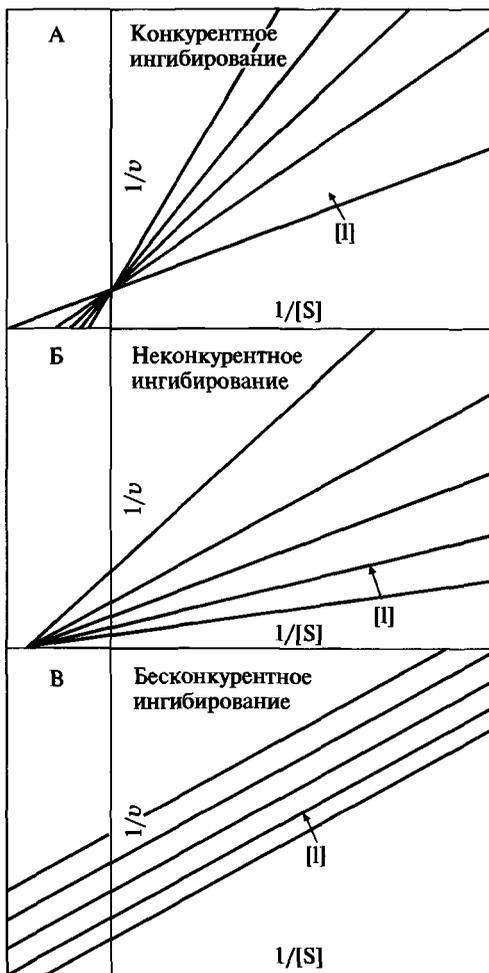


Рис. 3.4. Различные типы ингибирования, изображенные в координатах Лайнуивера-Берка: А — конкурентное, Б — неконкурентное, В — бесконкурентное ингибирование. Для построения графиков варьировали концентрацию субстрата; $[I]$ со стрелкой указывает направление роста концентрации ингибитора

кривая записывается в автоматическом режиме, например, с помощью фотометра, расчет может быть сделан на основании исходной кривой (без линеаризации), а вся информация и все константы найдены из одного-единственного эксперимента. Эта на первый взгляд притягательная методика не лишена, однако, серьезных недостатков, так что без соответствующего контроля пользоваться ею не рекомендуется. В частности, значительную погрешность при использовании данного метода вносит ингибирование продуктом реакции (которому подвержены практически все ферменты) и наличие обратимых реакций.

Хотя уравнение Михаэлиса-Ментен было выведено для необратимых односубстратных реакций, его можно применять и для анализа более сложных механизмов, например, ингибирования и большинства многосубстратных реакций, если только концентрации всех компонентов, кроме одного, поддерживаются на постоянном уровне. Обратимые реакции также можно анализировать с помощью этого уравнения, если условия эксперимента позволяют использовать значения начальных скоростей и образование продукта настолько незначительно, что им можно пренебречь. Для более подробного ознакомления с обработкой кинетических данных, полученных при проведении ферментативных реакций, рекомендуем обратиться к специальной литературе. В данной книге мы остановимся лишь на трех основных типах ингибирования — конкурентном, неконкурентном и бесконкурентном — различить которые можно с помощью линейных диаграмм, например, в двойных обратных координатах (см. рис. 3.4). Для анализа и идентификации этих типов ингибирования эксперимент строят по тому же принципу, что и в случае определения константы Михаэлиса: варьируют концентрацию субстрата, оставляя постоянной концентрацию всех остальных компонентов, в том числе и ингибитора. Проводят несколько серий таких экспериментов с различной концентрацией ингибитора. Эффективность ингибитора необходимо определить в предварительном эксперименте.

3.3 ТЕОРИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНАЛИЗА

3.3.1 Анализ кинетической кривой

Основной трудностью при обработке результатов ферментативных реакций является тот факт, что эти реакции протекают во времени не линейно; в данном случае одна стадия реакции

сменяется другой. В зависимости от конкретного фермента, выбранных условий реакции и других факторов, различные реакционные стадии проявляются более или менее отчетливо. Таким образом, только полное понимание основных принципов ферментативного катализа помогает избежать ошибок в толковании результатов ферментативной реакции.

К счастью, огромное множество ферментативных реакций может быть описано с помощью одного-единственного сравнительно простого выражения — все того же уравнения Михаэлиса-Ментен. Однако первым ограничением является то, что это уравнение было выведено для необратимой односубстратной реакции, тогда как большинство ферментативных реакций обратимы и протекают с участием двух или нескольких субстратов, кофакторов и коферментов. Учет всех этих факторов приводит к очень сложным выкладкам. Но даже эти сложные выражения можно упростить до уравнения Михаэлиса-Ментен при определенных условиях, в частности, если использовать исключительно начальные скорости реакции или рассматривать в качестве постоянных величин концентрации всех компонентов, за исключением концентрации одного субстрата. И все-таки нельзя гарантировать, что данные упрощения приемлемы в каждом конкретном случае.

Обычно ферментативный анализ проводят с целью определения активности фермента или концентрации субстрата. Подходы к решению этих двух задач различны, однако в обоих случаях необходимо понимание механизма ферментативной реакции. Итак, в первую очередь мы обратимся к рассмотрению хода обычной ферментативной реакции.

На рис. 3.5 представлен типичный ход реакции, начавшейся в момент добавления фермента или субстрата (момент времени 0). Данную кинетическую кривую можно условно разделить на три участка.

В стандартных экспериментальных условиях сначала наблюдается довольно крутой подъем, соответствующий *начальной скорости реакции*, который на самом деле является второй фазой реакции. По теории стационарного состояния и в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен эта область отвечает реакции нулевого порядка, поэтому кривая должна иметь вид линейной зависимости, так что скорость реакции можно определить непосредственно из угла наклона кривой.

Строго говоря, реакция начинается с еще более быстрой предстационарной фазы, но обычно экспериментатор этого не



Гис. 3.5. Фазы стандартной кинетической кривой, отражающей ход ферментативной реакции

учитывает, так как ее продолжительность чрезвычайно мала (от микро- до миллисекунд) и ее трудно зафиксировать в обычных условиях, поскольку скорость реакции пропорциональна количеству фермента, концентрация которого в ферментативной реакции очень низка. Проблемы могут возникнуть с интерпретацией так называемой лаг-фазы, которую иногда можно увидеть на кинетической кривой, и причин возникновения которой может быть несколько. Например, существует класс ферментов, называемых гистерезисными, которые, как принято считать, в отсутствие фермента находятся в неактивном состоянии, но начинают медленно активироваться при добавлении субстрата. В таких случаях для определения начальной скорости берут наиболее крутой участок кривой, хотя он уже не соответствует начальной скорости при $t = 0$. Наличие лаг-фазы может объясняться артефактами, такими как медленный разогрев измерительного оборудования, мутность окошка кюветы из-за повышенной влажности или выпадения осадка. Подобных артефактов следует избегать.

Основной проблемой при определении начальной скорости является выбор линейного участка кинетической кривой. Важно понимать, что допущение $d[ES]/cfr = 0$ с вытекающим из него следствием, что $d[P]/d\tau$ и $d[S]/dt$ — это константы (в реакции первого порядка), является необходимым условием примени-

мости уравнения Михаэлиса-Ментен. Таким образом, линейная прогрессия в начале ферментативной реакции должна выражаться как в увеличении количества продукта, так и в уменьшении количества субстрата. Если при анализе экспериментальной кривой такого линейного участка не наблюдается, следует сделать вывод, что уравнение Михаэлиса-Ментен в условиях данного эксперимента неприменимо, а реакция имеет более сложный механизм. Кроме того, следует помнить, что уравнение не было выведено для какой-то определенной концентрации субстрата, так что линейный участок должен наблюдаться при использовании любых, а не только «насыщающих» концентраций субстрата, как иногда думают. Часто неопытные исследователи, которые не могут обнаружить на кривой линейного участка, для определения начальной скорости пытаются провести касательную к экспериментальной кривой. Однако это не лучший путь решения проблемы. Прежде всего, следует попытаться оптимизировать условия ферментативной реакции, так чтобы линейный участок стал четко виден. На рис. 3.6 представлены кинетические кривые, полученные при разных концентрациях фермента, из которых видно, что линейный участок обычно может быть найден.

Основной причиной, из-за которой бывает сложно выделить линейный участок, являются неоптимальные условия проведения

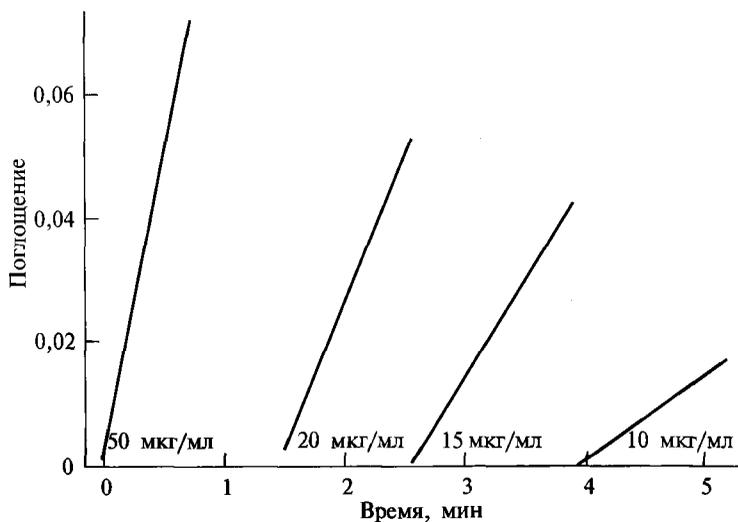


Рис. 3.6. Кинетическая зависимость реакции трипсина с 14-бензоил-L-аргинин-и-нитроанилидом. Использованы различные концентрации фермента; изменение поглощения регистрировали при 405 нм

эксперимента. Если кинетическая кривая выглядит не слишком хорошо, многие пытаются взять больше фермента, что в большинстве случаев неправильно. В действительности условия применимости уравнения Михаэлиса-Ментен или стационарные условия достигаются при *уменьшении* количества фермента. Часто реакция протекает настолько быстро, что реальную начальную скорость зафиксировать не удастся. В таком случае снижение концентрации фермента позволяет снизить скорость реакции и продлить участок, по которому можно определить начальную скорость. Снижать концентрацию фермента можно лишь до определенных пределов: в какой-то момент скорость реакции становится настолько малой, что не представляется возможным зафиксировать образование продукта на фоне базовой линии. В подобных случаях следует не увеличивать концентрацию фермента, а по возможности повышать чувствительность метода детекции. На самом деле, именно предел чувствительности метода может являться реальной причиной невозможности определения начальной скорости. Однако у каждого метода есть свои ограничения, так что если разница между сигналами продукта и субстрата чрезвычайно мала, или если эксперимент можно провести, лишь прерывая измерения на довольно длительные промежутки времени, тогда не представляется возможным построить такую кинетическую кривую, на которой можно было бы с достоверностью выделить линейный участок. В таких случаях обычно определяют тангенс угла наклона касательной к начальному участку кривой в момент времени $t = 0$ (метод касательных, см. рис. 3.9).

К сожалению, метод касательных, являющийся в некотором роде компромиссом в случае недостаточно удачных условий эксперимента, часто применяют и тогда, когда в этом нет необходимости, т. е. когда начальную скорость можно найти и без проведения касательной. Реальная кинетическая кривая не является абсолютно прямой линией; значения могут иметь некоторый разброс, и кривая может слегка отклоняться от линейной зависимости. Поэтому для проведения прямой линии следует пользоваться линейкой, но не нужно этим злоупотреблять и пытаться таким образом определять наклон действительно кривой линии. Особенно при использовании компьютеризованного оборудования, которое позволяет рассчитать начальную скорость методом линейной регрессии, следует убедиться в том, что выбранный для расчетов участок действительно является линейным.

В третьей фазе кинетической кривой линейный стационарный участок переходит в кривую с постепенно понижающимся

углом наклона, что связано с исчерпанием субстрата. Если для определения активности фермента необходимо знать только начальную скорость реакции, этот участок кривой не представляет интереса. В соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен осуществляется плавный переход от реакции нулевого к реакции первого порядка. Если допустить, что это уравнение справедливо, то по тангенсу угла наклона касательной в каждой точке кривой можно определить скорость реакции через текущую концентрацию субстрата ($-d[S]/dt$ и $d[P]/dt$, см. рис. 3.7). Поскольку величина сигнала (например, поглощения) в каждый момент времени должна быть пропорциональна текущей концентрации субстрата (или продукта), из одной-единственной кинетической кривой можно получить всю информацию относительно зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, как это следует из интегральной формы уравнения Михаэлиса-Ментен. Кинетические кривые, получаемые на компьютеризованном оборудовании, могут быть обчислены в автоматическом режиме, так что искомые значения можно получать параллельно с проведением эксперимента без особенных усилий. Однако без знания особенностей фермента не рекомендуется проводить анализ полной кинетической кривой с применением интегральной формы уравнения Михаэлиса-Ментен. Накопление продукта обычно замедляет реакцию как в результате ингибирования фермента, так и за счет стимуляции обратной реакции превращения продукта в исходный субстрат.

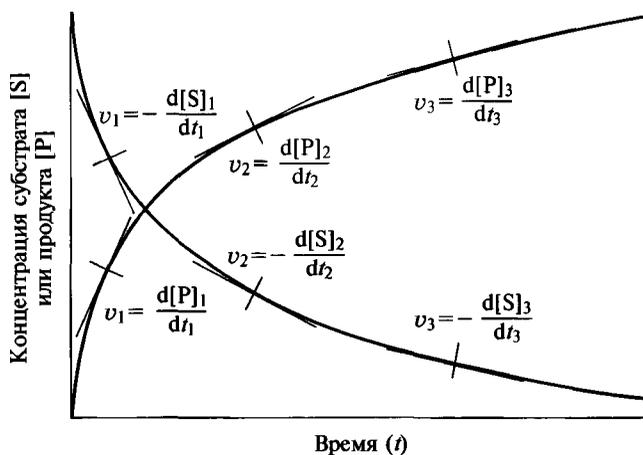


Рис. 3.7. Определение скорости реакции v из полной кинетической кривой методом касательных

Нелинейный третий участок полной кинетической кривой в конечном итоге переходит в плато, соответствующее полному исчерпанию субстрата или достижению состояния равновесия. В соответствии с асимптотическим характером данной зависимости, строго говоря, кривая выходит на плато лишь в бесконечности, но даже в реальности этот процесс занимает значительное время. Для определения начальных скоростей этот участок кривой не нужен, но для определения концентрации субстрата данная информация важна. Следовательно, если для определения концентрации фермента и проведения анализа в стационарном режиме обычно используют минимальные концентрации фермента, то для определения концентрации субстрата следует брать относительно высокие концентрации фермента, чтобы сократить время выхода кривой на плато. Нужно, однако, помнить, что количество субстрата в реакционной среде соответствует уровню плато лишь в том случае, если реакция необратима и весь субстрат превращается в продукт.

Литература

1. Michaelis, L., Menten, T.L. (1913) *Biochem. Z.* 49, 333-369
2. Brown, A.J., (1902) *J. Chem. Soc.* 81, 373-388
3. Henri, V., (1902) *Comptes rendues Acad. Sci.* 135, 916-919
4. Briggs, G.E., Haldane, J.B.S. (1925) *Biochem. J.* 19, 338—339
5. Haldane, J.B.S., Stern, K.G. (1932) *Allgemeine Chemie der Enzyme*. Steinkopff, Dresden & Leipzig

3.3.2 Проведение ферментативного анализа

3.3.2.1 ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Для характеристики любого нового фермента необходимо разработать удобный метод анализа. Но даже при использовании хорошо известного теста для определения активности уже изученного фермента необходимо понимать основные принципы ферментативного анализа, чтобы осознавать те важные правила, без которых невозможно построение эксперимента. Основной проблемой при разработке метода ферментативного анализа является выбор детектируемого сигнала, соответствующего либо образованию продукта, либо конверсии субстрата. Например, косубстрат многих оксидоредуктаз НАД (или НАДФ) имеет характерную полосу поглощения при 260 нм, которую легко детектировать спектральными методами в УФ-области (рис. 3.12). Однако примерно в этой же области находится полоса поглощения продукта его превращения — НАДН (или НАДФН).

В результате, несмотря на наличие сильного поглощения, по этому сигналу сложно отличить субстрат от продукта. При более детальном анализе оказывается, что при восстановлении НАД до НАДН происходит слабый сдвиг полосы поглощения в область более коротких волн. Этот сдвиг теоретически может служить сигналом протекания реакции, но его не очень удобно использовать на практике. Измерение сильного поглощения часто приводит к довольно большому разбросу данных, а наблюдение за слабыми изменениями на фоне большого разброса данных резко снижает чувствительность метода. Впрочем, в случае НАД ситуация благоприятна в том смысле, что при его восстановлении до НАДН (НАДФН) появляется новая полоса при длине волны 340 нм. И хотя интенсивность этой полосы ниже, чем полосы при 260 нм, сам субстрат (НАД) в этой области не дает никакого сигнала, так что поглощение при этой длине волны соответствует исключительно образованию продукта. Из этого можно сделать вывод, что выбор метода детекции должен определяться не наибольшей интенсивностью сигнала, а наибольшим различием в сигналах субстрата и продукта.

Совсем другая ситуация возникает в реакции, катализируемой глюкозоизомеразой, в результате которой глюкоза превращается во фруктозу. Оба сахара имеют одинаковый размер и практически не различаются по спектрам поглощения. Кроме того, реакция не является необратимой, но достигает состояния равновесия, в котором оба компонента присутствуют в одинаковых количествах. Это означает, что за ходом реакции с одним и тем же результатом можно следить с обеих сторон, взяв в качестве исходного субстрата глюкозу или фруктозу. Эти асимметрично построенные вещества отражают поляризованный свет в разной степени, что можно наблюдать с помощью поляриметра или по дисперсии оптического вращения. Такой подход возможен, однако из-за одновременного присутствия обоих веществ чувствительность метода невысока. Оба вещества различаются и по своей химической активности (глюкоза представляет собой альдозу, а фруктоза — кетозу), на чем может быть основан ферментативный метод детекции. С помощью красителей резорцина или карбазола, реагирующих преимущественно с кетозами с образованием окрашенных комплексов, можно следить за накоплением продукта. Но и на этом пути возникают проблемы. За появлением окраски нельзя следить непрерывно, так как она развивается в сильно кислой среде или при высокой температуре, при которых фермент не может работать. Поэтому реакцию необходимо останавливать через определенные промежутки времени, добавлять краситель и

ожидать появления окраски. Более того, окраска раствора нестабильна и меняется с течением времени, что еще более снижает точность определения. Учитывая все изложенное, по сравнению с простым и удобным методом определения НАД тест с глюкозоизомеразой является более трудоемким, менее чувствительным и не позволяет регистрировать полную кинетическую кривую.

В общем, методы, позволяющие получить полную кинетическую кривую, предпочтительнее тех, что основаны на анализе одной точки или на остановке реакции. Как обсуждалось выше, для определения констант необходимы значения начальных скоростей, которые можно определять, следя за непрерывным течением реакции. Если измерения можно производить лишь в отдельных точках, необходимо провести достаточное количество измерений в начальной фазе реакции с короткими временными интервалами, чтобы восстановить реальный ход реакции. При этом для построения хотя бы одной полной кинетической кривой требуется целая серия измерений с большим расходом фермента и большим количеством усилий. В результате для сохранения реагентов, времени и сил стараются количество экспериментальных точек свести к минимуму, например к одному-единственному измерению в определенное время после начала реакции. Затем скорость рассчитывают из угла наклона прямой, соединяющей нулевую точку при $t = 0$ с найденным значением в фиксированный момент времени t . Поскольку контроль линейности данного участка кинетической кривой в данном эксперименте отсутствует, необходимо произвести предварительный эксперимент, доказывающий, что в данных условиях условие линейности соблюдается. Но даже если подобный контрольный эксперимент был поставлен, необходимо помнить, что любое изменение условий, касающееся концентрации субстрата, фермента или кофактора, а также температуры или pH может изменить границы линейности начального участка и вызвать необходимость проведения нового контрольного эксперимента.

После того как был выбран основной метод анализа, следует определить оптимальные условия проведения эксперимента. Понятно, что результаты анализов, выполненных в разное время и в разных местах, можно сравнивать лишь при полном совпадении условий. Поскольку ферменты весьма чувствительны к воздействию различных факторов, необходимо поддерживать постоянные условия реакции, причем недоучет хотя бы одного из них может вызвать серьезные отклонения результатов. Хотелось бы определить стандартные условия, подходящие для любого ферментатив-

ного анализа, однако все ферменты индивидуальны и не подходят под общие стандарты. Некоторые ферменты предпочитают более кислые, а другие — более щелочные условия среды, одни активны при низких, а другие — при повышенных температурах. Это же относится и к ионной силе, наличию одновалентных и двухвалентных катионов и т.д. Таким образом, стандартные условия можно определить лишь для определенных ферментов, да и в этом случае они зависят от конкретного типа анализа. Ниже мы рассмотрим критерии выбора оптимальных параметров.

3.3.2.2 рН

Активность фермента сильно зависит от рН раствора по двум основным причинам: 1) наличие в активном центре протоноакцепторных групп; 2) необходимость поддержания общей структуры белка. Протоноакцепторные группы можно оттитровать и получить зависимость активности фермента от рН в виде кривой титрования, которая обычно имеет колоколообразную форму с максимумом в области нейтральных значений рН (оптимум рН). Обычно для проведения ферментативного анализа выбирают именно оптимальное значение рН. В большинстве случаев изменения активности, вызванные изменением рН, являются обратимыми, так что после инкубации в слабокислой или слабощелочной среде фермент вновь достигает максимальной активности при возвращении рН к оптимуму. Однако общие структурные изменения в молекуле фермента, вызванные изменением рН, часто необратимы, так что фермент не может достичь максимальной активности при возвращении рН к оптимальным значениям. Такие необратимые процессы происходят при крайних значениях рН, так что кривая рН-стабильности белка обычно шире кривой рН-оптимума активности; не следует подвергать фермент воздействию этих экстремальных значений рН.

Понятно, что стандартного оптимального значения рН для всех ферментов не существует, однако большинство ферментов предпочитают нейтральный (физиологический) диапазон рН, так что эксперименты чаще всего проводят при рН среды 7-7,5. Для ферментов, предпочитающих другие значения рН, например, пепсина или щелочной фосфатазы, при проведении эксперимента должны создаваться соответствующие условия. Иногда необходимо проводить эксперимент вне оптимального диапазона рН. Восстановление липоамида под действием НАДН + H⁺ в присутствии диафоразы проводят при рН 5,9, что способствует

образованию НАД⁺; по той же причине окисление этанола до ацетальдегида под действием НАД⁺ в присутствии алкогольдегидрогеназы проводят при рН 9,0.

3.3.2.3 ИОННАЯ СИЛА И БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Ионную силу раствора для проведения ферментативной реакции подбирают, варьируя молярность используемого буфера. Часто используют 0,1 М буферные растворы, ионная сила которых значительно ниже той, что существует внутри клетки. Более высокое значение ионной силы (около 1 М) может вызывать инактивацию фермента, хотя некоторые ферменты (из галофильных и термофильных организмов) предпочитают именно такие условия. Дестабилизация и инактивация ферментов может быть связана с самой природой буферного раствора в большей степени, чем с молярностью раствора. Стабилизирующее действие могут оказывать различные буферы, содержащие органические компоненты, но выбор наиболее подходящего буфера для каждого конкретного фермента осуществляется отдельно. Не всегда самый дорогой буфер оказывается наилучшим, и многие ферменты вполне стабильны в таких дешевых буферах, как фосфатный, хотя следует учитывать его способность образовывать комплексы с различными катионами. Часто используемый буфер Трис не годится для работы с некоторыми ферментами, а иногда вызывает их инактивацию. Кроме совместимости фермента с буферной системой следует учитывать ширину диапазона рН, в котором работает буфер. Этот диапазон обычно не более чем на единицу отличается от значения pK_a буфера в большую и меньшую сторону.

Поскольку активность фермента чрезвычайно чувствительна к изменениям рН, в процессе всего анализа должно поддерживаться постоянное, специально подобранное значение рН. Кроме того, компоненты реакционной смеси могут приводить к сдвигу рН, да и сама реакция может протекать с изменением рН (как в случае протонирования в реакциях, катализируемых дегидрогеназой), так что приходится контролировать конечное значение рН в реакционной смеси.

3.3.2.4 ТЕМПЕРАТУРА

В отличие от оптимума рН не существует температурного оптимума активности ферментов, хотя такие данные часто приводят

даже в общеизвестных учебниках. При исследовании зависимости активности ферментов от температуры на самом деле обнаруживается максимум, напоминающий рН-оптимум, однако в данном случае этот максимум является результатом наложения двух различных процессов. Благодаря ускорению движения молекул скорость химической реакции возрастает в 2-3 раза при повышении температуры на каждые 10° . Это относится и к ферментативным реакциям, и этот рост может продолжаться до очень высокой температуры. Однако из-за высокой чувствительности ферментов при повышении температуры начинает доминировать процесс денатурации и фермент инактивируется. Денатурация ферментов определяется двумя факторами — температурой и временем. При высокой температуре инаktivация происходит быстро, но даже при умеренной температуре возможна денатурация. Например, в случае алкогольдегидрогеназы инаktivация может произойти уже при физиологической температуре 37°C . Поскольку этот процесс развивается во времени, степень инаktivации зависит от того, как долго фермент находился в неблагоприятных условиях, прежде чем была измерена скорость катализируемой им реакции. Определенную роль играет и навык экспериментатора: в идентичных условиях определенное количество фермента при добавлении в реакционную смесь проявляет большую активность, чем то же количество фермента после длительной предварительной инкубации (например, при слишком медленной работе). Это, кроме того, еще один довод против использования температуры, при которой достигается наибольшая скорость реакции. С этой точки зрения стандартная температура эксперимента должна быть значительно ниже той, при которой достигается максимальная скорость реакции. Однако при слишком низких температурах скорость реакции низкая и для проведения анализа требуется более высокая концентрация фермента. Поэтому приходится принимать компромиссное решение.

При проведении анализа обычно выбирают одно из трех указанных ниже значений температуры.

- 25°C : Умеренная температура для чувствительных ферментов.

Это значение чуть превышает значение комнатной температуры, так что его легко поддерживать и нет необходимости предварительно инкубировать реакционную смесь (проводить эксперимент при комнатной температуре не рекомендуется, так как она не постоянна, а подвержена различным флуктуациям: открытые окна, солнечный свет и др.).

- 30 °С: Средняя температура, ближе к физиологическим условиям; рекомендуется для более стабильных ферментов.
- 37 °С: Для исследований в физиологических условиях, если только фермент остается стабильным при этой температуре. Поскольку для нагревания реакционной среды до данной температуры требуется определенное время, обычно необходима предварительная инкубация.

Для ферментов из организмов, обитающих в экстремальных условиях, таких как психрофилы или термофилы, требуются особые температурные условия.

3.3.2.5 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ

Кроме субстрата и буферного раствора для проведения некоторых ферментативных реакций требуются разнообразные специфические компоненты, такие как кофакторы или ионы металлов, которые либо напрямую задействованы в катализе, либо стабилизируют фермент, либо защищают его от инактивации. С одной стороны, одно- и двухвалентные катионы нейтрализуют избыточные заряды на поверхности белка и обеспечивают определенные виды связей, например солевые мостики. С другой стороны, ионы тяжелых металлов способствуют протеканию окислительных процессов, особенно с участием тиогрупп, что может изменить нативную структуру белка. Таким образом, добавление подобных ионов необходимо для одних ферментов, но губительно для других, и в последнем случае для удаления этих ионов в среду следует добавлять комплексообразователи типа ЭДТА или ЭГТА. Например, одним из компонентов пируватдегидрогеназного комплекса является фермент пируватдегидрогеназа, который активен только в присутствии ионов магния, однако для важной для катализа дитиогруппы в молекуле другого компонента этого комплекса — дигидролипоамид-дегидрогеназы — двухвалентные ионы губительны. Иными словами, для поддержания стабильности одного и того же ферментного комплекса нужны противоречащие друг другу условия. Ионы магния нужны для нейтрализации фосфатных групп в ферментативных реакциях с участием нуклеотидов (таких как АТФ). Ионы кальция необходимы некоторым протеазам для осуществления катализа и поддержания структуры. Реагенты с тиогруппами, такие как меркаптоэтанол или более эффективные реагенты Келланда — дитиотрейтол (ДТТ) и дитиозитрит (ДТЭ), — добавляют в концентрации 0,1–0,2 мМ для защиты сульфгидрильных групп.

Частой причиной нестабильности и инактивации ферментов является протеолиз. Даже очень хорошо очищенные ферментные препараты могут содержать следовые количества протеаз, которые присутствуют во всех клетках и, следовательно, в гомогенатах. Протеазы действуют в очень низких концентрациях, а очищенные белки особенно чувствительны к их действию, поскольку другие субстраты протеаз отсутствуют, а все возможные ингибиторы удалены. Часто нативная структура защищает белок от действия протеаз из той же клетки, но при переносе из клеточной среды в разбавленный буферный раствор молекулы белков могут претерпевать конформационные изменения, в результате чего возникающие незащищенные участки подвергаются действию протеаз. Существует ряд более или менее эффективных ингибиторов протеаз, которые можно добавлять в раствор для защиты ферментов. Для трех основных классов протеаз существуют соответствующие ингибиторы, но если тип протеазы неизвестен, следует добавлять все типы ингибиторов. Некоторые вещества защищают от протеаз всех типов, например, α_2 -макроглобулин. Лейпептин (0,5 мкг/мл), TLCK (Ь-1-хлор-3-(4-тозиламидо)-7-амино-2-гептанон, 0,05 мг/мл) и TPCK (Ь-1-хлор-3-(4-тозиламидо)-4-фенил-2-бутанон, 0,1 мг/мл) действуют как против сериновых, так и против цистеиновых протеаз.

Ингибитором сериновых протеаз является фенилметилсульфонилфторид (PMSF, 0,1 мг/мл), который связывается с ними ковалентно, подобно суицидному субстрату. Он плохо растворим в воде, поэтому запасной раствор готовят в ацетоне. В водных растворах PMSF быстро разлагается (время полураспада около 30 мин). Необратимой инактивации подвергается лишь та часть молекул протеаз, которые прореагировали немедленно, остальные остаются активными, поэтому реагент необходимо вносить снова.

К ингибиторам цистеиновых протеаз относятся E-64 (1Ч-[М-(Ь-3-иря«с-карбоксиран-2-карбонил)-Ь-лейцил]агматин, 0,01 мг/мл) или ингибитор кальпаина I (N-auema-Leu-Leu-Нор-лейциналь, 0,01 мг/мл).

Действие металлопротеиназ эффективно подавляется в присутствии комплексообразователей, таких как ЭДТА (этилендиаминтетраацетат, 1 мМ) или ЭГТА (этиленгликоль-бис-(Р-аминоэтилэфир)-1Ч,1Ч,1Ч,1Ч-тетраацетат), селективно связывающих ионы кдтьция. Однако эти вещества инактивируют и все другие металлозависимые ферменты.

Часто можно наблюдать, что ферменты менее стабильны в разбавленных растворах, чем в концентрированных растворах

как того же самого белка, так и какого-либо другого. Этот факт используют на практике, добавляя в растворы инертный бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл), но такими же защитными свойствами обладают глицерин и сахароза. Причин этого явления может быть несколько: более высокая концентрация белка больше соответствует ситуации внутри клетки, что может поддерживать общую структуру белковой молекулы. Кроме того, таким образом достигается определенная защита от вредного воздействия ионов тяжелых металлов, кислорода или протеаз.

3.3.2.6 КОНЦЕНТРАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Важным моментом, на который необходимо обратить внимание при проведении ферментативного анализа, является концентрация компонентов в реакционной смеси. Следует учесть два аспекта: концентрации компонентов должны быть достаточными, чтобы позволить зарегистрировать протекание реакции, но не слишком высокими, чтобы не оказать отрицательного влияния на ее течение. Обычно ферменты плохо работают, если концентрации каких-либо компонентов особенно высоки, так что концентрации выше 10 мМ часто оказываются неприемлемыми. В качестве примера приведем каталазу: константа Михаэлиса для ее субстрата H_2O_2 составляет 0,025 М, но при добавлении такой концентрации перекиси фермент очень быстро инактивируется. При проведении ферментативного анализа все компоненты (субстраты, кофакторы или коферменты) должны присутствовать в насыщающих концентрациях, чтобы небольшие вариации абсолютных значений концентраций (например, связанные с неточностью внесения растворов в пробирки) не влияли на скорость реакции, которая зависела бы только от варьируемого параметра, обычно — концентрации фермента. Поскольку полное насыщение достигается при бесконечно больших концентрациях компонентов, их количество в реакционной среде должно хотя бы в 10 раз превосходить значение K_m или K_i (при этом достигается лишь 91% насыщения). Например, в случае НАДН 10-кратное превышение концентрации по отношению к константе Михаэлиса (10^{-5}) в реакции с алкоголь- или лактатдегидрогеназой позволяет получить значение поглощения 0,63 при 340 нм, так что чувствительность оптических измерений невысока. Для некоторых ферментов описано явление ингибирования собственными субстратами, присутствующими в большой концентрации

(субстратное ингибирование). В подобных случаях насыщающая концентрация субстрата не достигается.

Другие компоненты добавляют в реакционную среду в концентрациях, определяемых экспериментальным путем. Комплексообразующие вещества типа ЭДТА должны быть взяты в избытке по отношению к тем ионам, которые необходимо связать, обычно в концентрации около 1 мМ. Кроме того, в некоторых реактивах могут содержаться добавки, такие как сульфат аммония, детергенты, кислые или щелочные компоненты или органические растворители, которые могут нарушать течение реакции либо за счет непосредственного взаимодействия с ферментом, либо путем изменения условий (рН, поллярность и др.).

Иногда может происходить спонтанное изменение наблюдаемых параметров, которое выглядит как ферментативная реакция. Это может происходить из-за появления мутности или выпадения осадка, а также образования влаги на стенках кюветы. Важные компоненты смеси могут подвергаться спонтанному окислению под действием растворенного в смеси кислорода или других веществ, в результате чего возникает постоянный рост или снижение сигнала. Если эти спонтанные реакции нельзя подавить, следует вносить поправки, используя соответствующий контроль.

Особое внимание следует также обратить на приготовление растворов, особенно при приготовлении серии разведений для определения константы Михаэлиса или константы ингибирования. С целью экономии времени некоторые вещества иногда добавляют прямо в реакционную смесь, уже находящуюся в фотометрической кювете (рис. 3.8). Эту процедуру можно облегчить, если использовать автоматическую пипетку, но это не всегда хорошо. Дело в том, что при добавлении различных объемов реагента общий объем смеси будет различаться, да и точность пипеток ограничена, особенно это касается малых объемов (около 1 мкл). Кроме того, использование разных пипеток для разных объемов также может вносить определенную ошибку. Действительно, наибольшую ошибку в результат измерений вносит именно раскапывание растворов по пробиркам. Поэтому лучше готовить серию разведений для различных веществ и добавлять в реакционную смесь каждый раз один и тот же объем раствора. На рис. 3.8 представлены две схемы приготовления таких разведений. Добавление возрастающих количеств вещества из запасного раствора и доведение до постоянного объема является более предпочтительным по сравнению с постепенным переносом раствора из каждой пробирки в

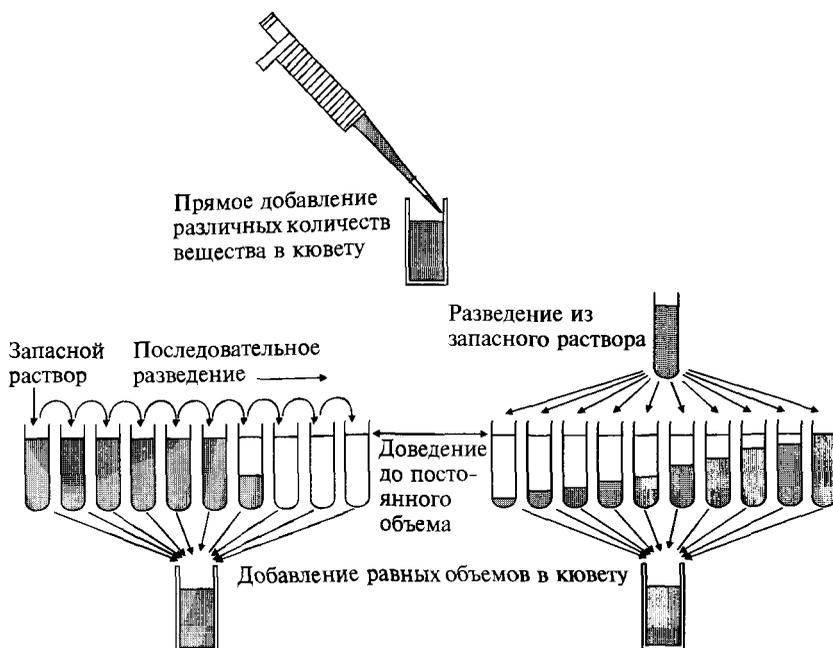


Рис. 3.8. Три варианта приготовления раствора вещества (например, субстрата) с определенной концентрацией в кювете для спектрального анализа

следующую, поскольку во втором случае ошибка, допущенная при приготовлении раствора в одной пробирке, распространяется далее на все последующие.

3.3.3 Активность фермента

3.3.3.1 ЕДИНИЦЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Как уже обсуждалось выше, скорость ферментативной реакции определяют по начальному линейному участку кривой, построенной при стандартных условиях в присутствии насыщающих концентраций всех субстратов. По определению скорость реакции равна количеству превращенного субстрата или образовавшегося продукта в единицу времени: $v = -d[S]/dt = d[P]/dt$. Однако концентрация субстрата и продукта и время могут быть выражены в разных единицах измерения. С целью унификации единиц измерения в 1971 г. Комиссия по ферментам Международного Союза Биохимиков (IUB) ввела международную единицу ферментативной активности (Ш, в русской литературе — ME),

которая определяется как активность фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в минуту. Эта единица стала повсеместно использоваться, но лишь два года спустя в 1973 г. Комиссия по номенклатуре в биологии связала МЕ с системой СИ: 1 катал (кат) — это активность фермента, превращающего 1 моль субстрата в секунду. Таким образом, 1 МЕ = 0,000 000 016 667 кат, а 1 кат = 60 000 000 МЕ. Хотя официальной единицей измерения ферментативной активности является катал, она практически не используется, поскольку является слишком крупной единицей измерения. Например, для изменения оптической плотности на 0,063 за минуту (удобная скорость для реакций с дегидрогеназой) необходимо 0,01 МЕ или 0,000 000 000 167 кат. Поэтому на фирменных ферментных препаратах обычно указывают международные единицы (обычно от 100 до 10 000 МЕ). Можно также измерять активность ферментов в нанокаталах (1 МЕ = 16,67 нкат, 1 нкат = 0,060 МЕ). Кроме того, существуют специальные единицы измерения (например, единицы Ансона для протеаз), особенно часто ими пользуются в тех случаях, когда трудно точно определить молярность продукта реакции. Для характеристики микробной конверсии веществ вместо ферментативной активности можно использовать продуктивность $P_N = \frac{A_{z_{\text{prod}}}}{w_{\text{dry}} \times t}$, где $A_{z_{\text{prod}}}$ — количество образовавшегося продукта, w_{dry} — сухой вес клеток, t — время конверсии.

3.3.3.2 КОЭФФИЦИЕНТ ПОГЛОЩЕНИЯ

При автоматической регистрации хода ферментативной реакции количество конвертированного субстрата или образовавшегося продукта откладывается по оси ординат, а время реакции — по оси абсцисс. Если за ходом реакции следят фотометрическим методом, нужно определить изменение поглощения за 1 с или 1 мин (рис. 3.9). На практике одной секунды (а иногда и одной минуты) слишком мало, чтобы достоверно зафиксировать изменение поглощения, так что для расчетов выбирают более длительный временной интервал (например, 100 с) и произошедшее за это время изменение поглощения делят на соответствующее время. Так определяют изменение поглощения за 1 с или 1 мин, которое связано с концентрацией субстрата или продукта через коэффициент поглощения ϵ (прежнее название «коэффициент экстинкции» отменено в 1972 г.). Необходимо определить, связано ли поглощение при выбранной длине волны с субстратом или с продуктом, в таком случае следует учитывать лишь один

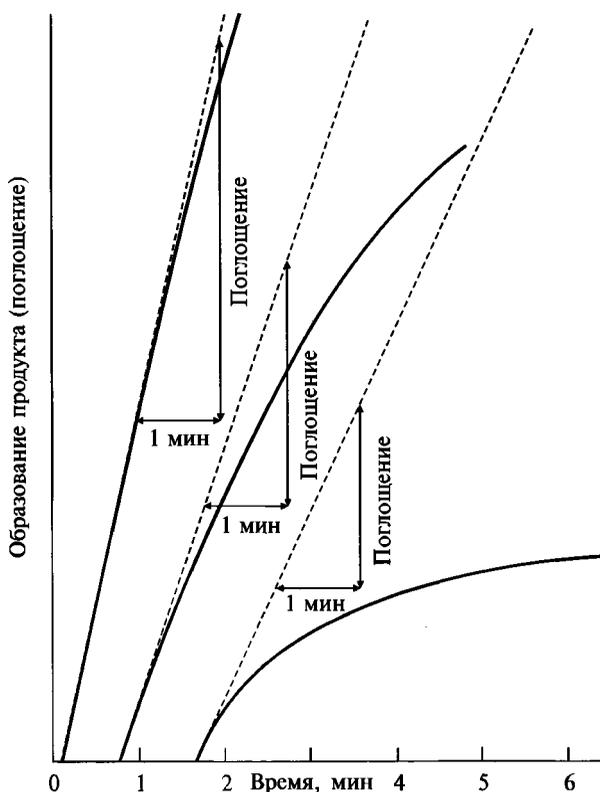


Рис. 3.9. Определение начальной скорости реакции методом касательных.

Проводят касательную к начальному участку полной кинетической кривой, а угол ее наклона определяют как разность между значениями поглощения, полученными с интервалом 1 мин

коэффициент поглощения, либо следует учитывать разницу между коэффициентами поглощения этих двух веществ. В случае реакции, катализируемой дегидрогеназой, при 340 нм следует учитывать лишь коэффициент поглощения для НАДН, который составляет $\epsilon_{340} = 6300 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Это значит, что поглощение 1 М раствора НАДН в кювете с длиной светового пути 1 см составляет 6300. Если, например, за 1 мин происходит изменение поглощения (A_D), равное 0,1, это означает, что произошло превращение 15,9 мкМ НАДН, что соответствует 0,0159 мкмоль в 1 мл реакционной смеси в кювете. Следовательно, в 1 мл смеси в кювете содержится 0,0159 МЕ (или около 0,265 нкат) соответствующей ферментативной активности.

Существуют разные варианты размерности молярного коэффициента поглощения, что иногда приводит к путанице. В большинстве случаев пользуются размерностью л·моль⁻¹·см⁻¹, что эквивалентно М⁻¹·см⁻¹. Разделив числитель и знаменатель на 1000, получим размерность мл·ммоль⁻¹·см⁻¹, а разделив числитель и знаменатель на см, получим см² ммоль⁻¹ (мл = см³). Для приведенного выше коэффициента поглощения НАДН с использованием любой из этих размерностей величина поглощения 1 М раствора в кювете с длиной светового пути 1 см при данной длине волны имеет значение 6300. Поскольку это значение неправдоподобно высокое, лучше перейти к коэффициенту поглощения, выраженному в миллимолях (ммМ⁻¹·см⁻¹) или микромолях (мкМ⁻¹·см⁻¹). В системе СИ используется размерность л·моль⁻¹·мм⁻¹, для перехода к которой численное значение е следует разделить на 10 (для НАДН $\epsilon_{340} = 630$ л·моль⁻¹·мм⁻¹).

Если коэффициент поглощения неизвестен, следует использовать стандартную калибровочную кривую для субстрата или продукта.

3.3.3.3 РАСЧЕТ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Ферментативная активность (*в объемном выражении*) рассчитывается по следующей формуле:

$$\begin{aligned} \text{Единицы} & & \text{измеренное значение} \times \text{объем реакц. смеси} \times \\ \text{активности} & = & \frac{\text{коэффициент разведения (ФР)}}{\text{время} \times \text{концентрационная константа} \times} \\ \text{мл р-ра фермента} & & \text{объем фермента} \\ & & \frac{\text{поглощение в единицу времени} \times}{\text{объем реакц. смеси} \times \text{ФР}} \\ & = & \frac{\text{коэффициент поглощения} \times}{\text{объем фермента}} \end{aligned}$$

В каталах или международных единицах это выражение примет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{\text{Катал}}{\text{мл р-ра фермента}} & = \frac{\Delta A/\text{с} \times \text{объем реакц. смеси (мл)} \times \text{ФР}}{\epsilon_{\text{nm}} (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}) \times \text{объем фермента (мл)} \times 1000} \\ \frac{\text{МЕ}}{\text{мл р-ра фермента}} & = \frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{объем реакц. смеси (мл)} \times \text{ФР} \times 10\,000}{\epsilon_{\text{nm}} (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}) \times \text{объем фермента (мл)}} \end{aligned}$$

Здесь считается, что за ходом ферментативной реакции можно следить непрерывно — с помощью оптического или другого спектроскопического метода (рис. 3.9). Для экспериментов, основанных на единственном измерении, для расчета берут разность между этим единственным значением и контрольным значением. Например, если ферментативную реакцию останавливают через 10 мин и находят, что $A = 0,71$, а поглощение контрольной смеси составляет 0,16, то $\text{ДЛ/мин} = 0,055$, а на основании этого значения можно найти активность фермента, как описано выше. Это рассуждение верно лишь в том случае, если ход реакции остается линейным на всем протяжении измерения, иначе начальная скорость не будет равна одной десятой найденной величины, а будет несколько больше этого значения (рис. 3.10). В этой связи рекомендуется получить несколько экспериментальных точек через разные промежутки времени, чтобы проверить линейность выбранного участка.

Существуют два основных способа выражения ферментативной активности. Активность в единице объема (в 1 мл) при умножении на общий объем раствора фермента дает *общую активность фермента*. Это значение важно знать, например, при выделении фермента, когда необходимо сравнивать количество фермента на

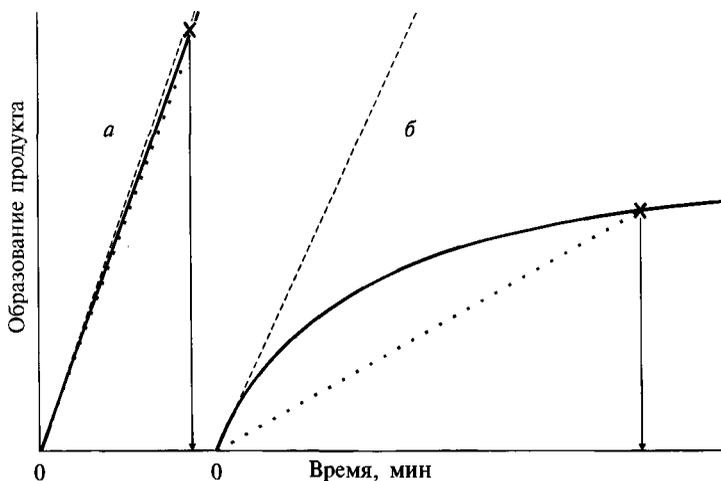


Рис. 3.10. Определение скорости реакции путем остановки реакции. Реакцию останавливают через определенный промежуток времени (стрелка) и определяют скорость по углу наклона прямой (■ • • •), соединяющей нулевую точку (0) с конечной точкой (X), при линейном (а) и нелинейном (б) ходе кривой. Истинную начальную скорость определяют методом касательных (-----)

последовательных стадиях очистки. На разных стадиях очистки объем раствора фермента различен. Потеря общей активности на каждой стадии характеризует выход фермента. Выход фермента на каждой стадии выражают в процентах, принимая за 100% первое определенное значение (грубый экстракт, полученный при разрушении клеток), и сводят в единую таблицу.

Количество единиц ферментативной активности, разделенное на количество белка (в мг), дает *удельную ферментативную активность*. Максимальная удельная активность фермента достигается, когда фермент полностью сохраняет свою активность и свободен от примесей посторонних белков (и по возможности от всех других примесей, таких как нуклеиновые кислоты, которые не детектируются методами для определения белка). Это оптимальное значение определяют для каждого фермента эмпирически, поскольку общего стандартного значения удельной активности не существует. Даже ферменты, которые по данным электрофореза не содержат примесей, могут содержать определенную долю частично денатурированного белка с ослабленной или вовсе утерянной активностью, так что даже ферменты с одинаковой степенью чистоты могут отличаться по удельной активности. Приближение удельной активности, полученной на определенной стадии очистки белка, к оптимальному значению говорит об эффективности данной стадии очистки. При выделении белка этот показатель называют степенью очистки.

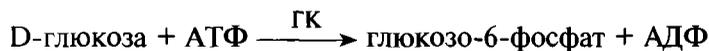
Каталитическую константу можно определить, поделив максимальную скорость реакции на общую концентрацию фермента: $K_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]_0}$; как и константа скорости реакции первого порядка, каталитическая константа имеет размерность $\text{кат/моль} = \text{с}^{-1}$. *Число оборотов* фермента представляет собой каталитическую константу, разделенную на число активных центров в молекуле фермента (для мономерных ферментов число оборотов эквивалентно каталитической константе). Этот параметр показывает число молей субстрата, превращенных в активном центре фермента за секунду. Число оборотов для различных ферментов совершенно различно: 20 для сукцинатдегидрогеназы, 210 для Р-галактозидазы, 330 для гексокиназы, 1500 для холинэстеразы, 90 000 для каталазы и 600 000 с^{-1} для карбоангидразы С.

Отношение каталитической константы к константе Михаэлиса k_{cat}/K_M ($\text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$) называют *эффективностью катализа*. Это отношение имеет размерность константы скорости реакции второго порядка и является показателем специфичности фермента к субстрату, чем выше значение — тем больше специфичность.

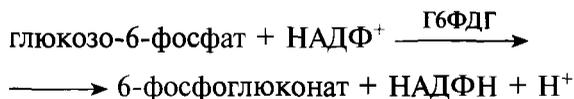
3.4 ТЕОРИЯ СОПРЯЖЕННЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

3.4.1 Две сопряженные реакции

За ходом ферментативной реакции следят либо по накоплению продукта, либо по расходу субстрата. В обоих случаях необходимо, чтобы между субстратом и продуктом существовало явное различие, такое как разница в поглощении или интенсивности флуоресценции. Если это не так, для детекции можно использовать вторую (а иногда и третью) сопряженную реакцию. В качестве примера приведем катализируемую гексокиназой (ГК) реакцию фосфорилирования D-глюкозы:



Глюкозо-6-фосфат — это субстрат глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФДГ):



Хотя превращение субстратов гексокиназной реакции в продукты не сопровождается сильным изменением поглощения, образующийся НАДФН легко определить по характерной полосе поглощения при 340 нм. Если в реакционную смесь поместить оба фермента, глюкоза, АТФ и НАДФ⁺ будут превращаться в НАДФН и 6-фосфоглюконат. Понятно, что при проведении сопряженных реакций следует учитывать дополнительные факторы. Необходимо поддерживать стандартные условия одновременно для двух ферментов, что непросто, если эти ферменты различаются по температурной и рН-зависимости. Например, фермент из термофильного источника достигает максимальной активности при такой температуре, при которой другой фермент денатурирует. Важным фактором, который необходимо учитывать, является положение равновесия в сопряженных реакциях. В случае определения глюкозы равновесие в реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой, способствует окислению глюкозо-6-фосфата, так что можно считать, что реакция протекает количественно. В последовательностях реакций подобного рода хотя бы последняя из них должна протекать количественно, в противном случае ее сложно использовать для количественной оценки результата предыдущей реакции. С другой стороны, если

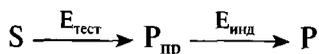
равновесие первой реакции смещено в сторону образования субстрата, сопряженная реакция может, тем не менее, протекать количественно, если следующая за ней индикаторная реакция протекает необратимо в сторону образования продукта, выводя тем самым продукт предыдущей реакции из равновесия.

Итак, первым требованием при разработке ферментативного метода анализа, основанного на сопряженных реакциях, является выбор подходящих условий для всех задействованных ферментов. Если подобрать такие условия не представляется возможным, тест можно осуществить лишь последовательно, дожидаясь, пока первая реакция завершится, и лишь затем проводить следующую.

Сопряженные ферментативные системы подчиняются определенным правилам. Концентрацию лишь одного из двух ферментов можно вычислить (*тестовая реакция*), а концентрацию второго измеряют в эксперименте (*индикаторная реакция*). В связи с этим индикаторная реакция не должна быть лимитирующей по ферменту, субстрату, кофактору или косубстрату (НАДФ в вышеприведенном примере), которые должны присутствовать в большом избытке. Кроме того, всегда следует помнить, что любые изменения условий эксперимента (изменение концентрации субстратов или кофакторов, добавление ингибиторов и др.) могут приводить к тому, что индикаторная реакция станет лимитирующей и сделанные выводы окажутся некорректными.

При проведении ферментативного анализа с применением сопряженных реакций различают два случая. Обычно индикаторная реакция следует за той, что нужно проанализировать, как в случае с гексокиназой, и детектируемый компонент появляется в конце реакционной цепочки. Однако в некоторых ситуациях индикаторная реакция протекает перед тестовой реакцией. Эти два случая анализируют по-разному.

Сопряженные реакции протекают в оптимальных условиях, если устанавливается стационарная фаза, в которой скорость образования и превращения промежуточного продукта ($P_{1ф}$) постоянна:



Такое состояние должно быть достигнуто как можно быстрее. Для этого тестируемый фермент, концентрация которого является лимитирующей, должен работать при насыщающей концентрации субстрата $[S] \gg K_m$, так что $v_{\text{Тест}} \ll v_{\text{мин тест}}$. Для индикаторной реакции необходимо взять избыток фермента $E_{\text{инд}}$. Обобщающая реакция начинается с лаг-фазы, на протяжении

которой возрастает стационарная концентрация промежуточного продукта. Поскольку $P_{\text{пр}}$ образуется в результате первой реакции с постоянной скоростью, индикаторный фермент также реагирует с постоянной скоростью $v_{\text{инд}}$, для которой справедливо уравнение Михаэлиса-Ментен (с $[P_{\text{пр}}]$ в качестве концентрации субстрата). Поскольку $v_{\text{ТССТ}} \ll F_{\text{max тест}}$, эффективная скорость индикаторной реакции должна быть равна максимальной скорости тестовой реакции $V_{\text{max тест}}$:

$$v_{\text{инд}} = \frac{V_{\text{max, инд}} [P_{\text{пр}}]}{K_{\text{M, инд}} + [P_{\text{пр}}]} = V_{\text{max, инд}} \quad (18)$$

Концентрацию промежуточного продукта в этих условиях можно найти по уравнению

$$[P_{\text{пр}}] = \frac{K_{\text{M, инд}} V_{\text{max, тест}}}{V_{\text{max, инд}} - V_{\text{max, тест}}} \quad (19)$$

Понятно, что изменения концентрации промежуточного продукта обратно пропорциональны максимальной скорости индикаторной реакции и количеству задействованного в ней фермента ($K_{\text{таx инд}} = \kappa_{\text{мл}} [E_{\text{инд}}]$). Таким образом, высокая концентрация индикаторного фермента снижает $[P_{\text{пр}}]$ и приближает течение сопряженных реакций к линейным условиям. В результате взаимного влияния двух реакций, в которых задействованы различные компоненты, обобщающая реакция может иметь различный порядок. Нулевой порядок (линейность) достигается в том случае, если тестовая реакция протекает с максимальной скоростью $F_{\text{max тест}}$. Для стационарной фазы, когда $[P_{\text{пр}}] = \text{const}$, можно записать:

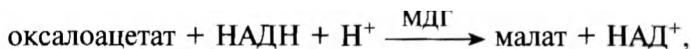
$$v_{\text{инд}} = \frac{V_{\text{max, инд}} [P_{\text{пр}}]}{K_{\text{M, инд}} + [P_{\text{пр}}]} = \frac{V_{\text{max, инд}}}{K_{\text{M, инд}}/[P_{\text{пр}}] + 1} \quad (20)$$

Поскольку знаменатель $K_{\text{M, инд}}/[P_{\text{пр}}] + 1$ также представляет собой константу, реакция протекает с постоянной скоростью. Важно, чтобы стационарная фаза (реакция нулевого порядка) достигалась быстро, поскольку начальная лаг-фаза развивается асимптотически, а концентрация субстрата постоянно падает, так что время, на протяжении которого сохраняется насыщающая концентрация субстрата, ограничено.

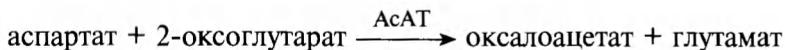
Сопряженные реакции с двумя субстратами анализируют аналогичным образом. Пока оба субстрата присутствуют в насыщающей концентрации, поддерживается условие $v_{\text{Тест}} = F_{\text{maxXi тест}}$.

Однако часто бывает сложно создать насыщающие условия по обоим субстратам одновременно: так, в примере с дегидрогеназой НАДН нельзя вносить в очень высокой концентрации из-за слишком сильного поглощения.

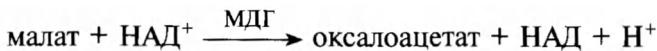
Обычно индикаторная реакция следует за тестируемой реакцией. Однако ситуация может быть обратной, например, если субстрат тестируемого фермента нестабилен и должен попадать в систему в результате предшествующей реакции. Если предшествующая реакция необходима только для образования субстрата, а за ходом тестируемой реакции можно следить непосредственно, то проблем не должно возникать до тех пор, пока фермент первой реакции присутствует в избытке, так что тестовая реакция лимитирует скорость всего процесса. Такая ситуация наблюдается в реакции, катализируемой малатдегидрогеназой (МДГ):



если нестабильный оксалоацетат поступает в систему в результате реакции, катализируемой аспаратаминотрансферазой (АсАТ):



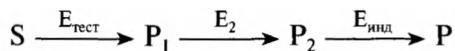
Сложнее разобраться в ситуации, когда реакция, поставляющая субстрат для тестовой реакции, одновременно является индикаторной. В качестве примера приведем катализируемую цитратсинтазой (ЦС) реакцию, субстрат для которой (оксалоацетат) образуется в результате малатдегидрогеназной реакции:



Расход оксалоацетата для превращения ацетата не находится в прямо пропорциональной зависимости от восстановления НАДН из-за равновесия, существующего между двумя реакциями. В результате измеряемые концентрации НАДН занижены. Равновесие первой реакции сдвинуто в сторону образования малата, так что НАДН образуется благодаря удалению оксалоацетата во второй реакции. Обычно в системах, в которых индикаторная реакция протекает первой, равновесие индикаторной реакции должно быть сдвинуто в сторону образования субстрата, а равновесие суммарной реакции должно способствовать образованию конечного продукта.

3.4.2 Три сопряженные реакции

Ситуация с тремя сопряженными ферментативными реакциями аналогична той, что рассмотрена выше. Первую реакцию осуществляет тестируемый фермент, затем следует вторая реакция (E_2), связывающая тестовую и индикаторную реакции:



В данном случае концентрация обоих промежуточных продуктов P_1 и P_2 должна быть очень низкой, чтобы сократить продолжительность начальной лаг-фазы. Эффективные скорости связывающей и индикаторной реакций должны иметь сходные значения, близкие к значению максимальной скорости тестовой реакции:

$$V_{\text{max, тест}} = v_2 = v_{\text{инд}}$$

3.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

Высокую специфичность ферментов можно использовать для определения точной концентрации различных веществ, например метаболитов, даже в грубом клеточном экстракте. Эти вещества должны являться субстратами используемого фермента и превращаться под его воздействием в продукт. Происходящие при этом изменения указывают на наличие искомого вещества и позволяют определить его концентрацию. Именно относительные изменения параметров, а не абсолютное значение поглощения определяет количество анализируемого вещества, что делает возможным его обнаружение на фоне множества других веществ. Понятно, что особенно в случае анализа грубых экстрактов следует учитывать возможность возникновения побочных реакций. За ходом реакции следят либо непосредственно, если существует прямой метод детекции субстрата или продукта, либо путем ее сопряжения с другой ферментативной реакцией с детектируемым продуктом (например, с помощью дегидрогеназной реакции). Существуют два принципиально различающихся метода определения концентрации субстрата ферментативной реакции — метод конечной точки и кинетический метод.

3.5.1 Метод конечной точки

Метод конечной точки является наилучшим и простейшим способом определения концентрации в тех случаях, когда суб-

страт или продукт можно детектировать напрямую, а реакция протекает необратимо. Реакцию запускают добавлением фермента, соблюдая оптимальные для анализа условия. За ходом реакции следят либо непрерывно (например, фотометрически), либо анализируют пробы, отобранные через определенные промежутки времени. При завершении реакции кинетическая кривая выходит на плато, высота которого непосредственно связана с количеством образовавшегося продукта. Используя коэффициент поглощения или калибровочную кривую для стандартного раствора, можно рассчитать концентрацию продукта. Поскольку реакция протекает необратимо, концентрация продукта должна быть эквивалентна концентрации субстрата. Нужно, конечно, помнить, что настоящее плато достигается лишь в бесконечности, так что преждевременная остановка эксперимента приводит к недооценке концентрации анализируемого вещества. Поскольку медленные ферментативные реакции выходят на плато довольно долго, следует использовать высокие концентрации фермента, что также помогает избежать влияния инактивации или побочных реакций.

В двухсубстратных реакциях можно определять не только концентрацию субстрата, но и косубстрата (например, НАДН), реагирующего в том же стехиометрическом отношении, что и субстрат. Нужно, однако, быть уверенным, что косубстрат (а также все другие компоненты реакционной смеси) не являются лимитирующими, поскольку если концентрация косубстрата оказывается ниже искомой концентрации субстрата, то в результате анализа будет найдена именно концентрация косубстрата, а не субстрата.

Для определения концентрации субстрата начальные скорости реакции не имеют значения, как в случае определения активности фермента, так что наличие условий стационарности не является необходимым. Большой интерес представляет заключительная фаза реакции, которая в простейшем случае подчиняется кинетике реакции первого порядка (или псевдопервого порядка) в двухсубстратных реакциях при избытке косубстрата):

$$\ln [S] = \ln [S]_0 - k_1 t \quad (21)$$

Как видно из табл. 3.2, необходимое для практически полного превращения субстрата время примерно в 10 раз больше того, за которое достигается 50% конверсии. Это, конечно, лишь ориентировочное соотношение, которое в реальной ситуации может быть другим, поскольку конкретная реакция не обязательно яв-

Таблица 3.2. Время, необходимое для превращения субстрата в продукт в гипотетической необратимой реакции первого порядка со временем полуреакции 10 мин

Количество продукта, % $[S]_0$	Время реакции, мин
50	10,0
80	23,3
90	33,3
95	43,4
98	56,5
99	66,7
99,9	100,0

ляется реакцией первого порядка. Кроме того, следует учитывать такие дополнительные факторы, как ингибирование продуктом реакции, которое может увеличивать время, необходимое для достижения равновесия.

В реальности многие ферментативные реакции не являются необратимыми, а достигают определенного состояния равновесия, так что субстрат не может количественно превращаться в продукт. Для определения концентрации субстрата в данном случае есть две возможности. Поскольку в конце реакции устанавливается состояние равновесия, то между субстратом и продуктом должно соблюдаться определенное соотношение, из которого можно определить текущую концентрацию субстрата. Определяют долю продукта, образующегося из известного исходного количества субстрата, а затем, пользуясь этим значением и проводя реакцию в тех же условиях, находят неизвестную концентрацию субстрата в анализируемых образцах.

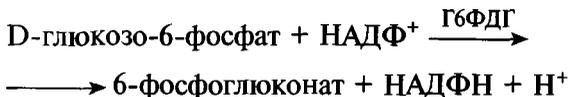
Другой подход состоит в осуществлении полной конверсии субстрата даже при неблагоприятном положении равновесия. Этого можно достичь, если выводить из реакции образующийся продукт с помощью дополнительной химической или ферментативной реакции. Часто альдегиды или кетоны (например, в реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой) выводят из реакции с помощью семикарбазида или гидразина. Протоны можно вывести из реакционной среды, смещая рН в щелочную область. Еще один пример — реакция, катализируемая глицеральдегидфосфатдегидрогеназой. При замене неорганического фосфата на арсенат вместо фосфата образуется нестабильный 1-арсено-3-фосфоглицерат, быстрый распад которого полностью смещает реакцию в сторону образования продукта.

3.5.2 Сопряженные ферментативные реакции

Сопряженные ферментативные реакции часто используют для определения концентрации субстрата. Поскольку нужно определить лишь одно конечное значение, требования к сопряженным реакциям для определения концентрации субстрата не такие строгие, как для определения активности фермента. Важно только, чтобы в финальной индикаторной реакции происходило количественное образование продукта. Индикаторной реакции может предшествовать одна или несколько реакций. Они не обязательно должны быть необратимыми, поскольку индикаторная реакция смещает равновесие промежуточных реакций в сторону образования продукта. Если в последовательности реакций задействовано два или более ферментов, лишь один должен обязательно быть специфичным к своему субстрату. Примером может служить относительно неспецифическая реакция превращения глюкозы под действием гексокиназы (ГК):



Фермент осуществляет также конверсию других гексоз, в частности фруктозы и маннозы. Для селективного определения глюкозы вместо гексокиназы можно использовать более специфичный (но примерно в 250 раз более дорогой) фермент глюкокиназу. Однако последующая индикаторная реакция, катализируемая D-глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназой, строго специфична по отношению к D-глюкозо-6-фосфату, так что побочные продукты действия гексокиназы не будут мешать количественному определению глюкозы в сопряженном анализе.



3.5.3 Кинетический метод определения концентрации субстрата

Согласно уравнению Михаэлиса-Ментен, концентрация субстрата связана со скоростью ферментативной реакции следующим образом:

$$[\text{S}] = \frac{K_M v}{V_{\max} - v} \quad (22)$$

Таким образом, если известны значения констант K_M и $V_{m, ЛДХ}$, можно определить концентрацию субстрата. Кроме того, неизвестную концентрацию субстрата можно определить, если построить стандартную кривую зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, имеющую гиперболический вид и подчиняющуюся уравнению Михаэлиса-Ментен. Понятно, что концентрацию субстрата можно найти лишь в области низких концентраций, где $[S] < K_M$.

Более строгие зависимости можно записать для реакций первого порядка. В данном случае превращение субстрата за период времени $\Delta t = t_2 - t_x$ прямо пропорционально исходной концентрации субстрата $[S]_0$:

$$\frac{-d[S]}{dt} = k_1 [S] \quad (4)$$

$$[S] = [S]_0 e^{-k_1 t} \quad (5)$$

$$\frac{-d[S]}{dt} = k_1 [S]_0 e^{-k_1 t} \quad (23)$$

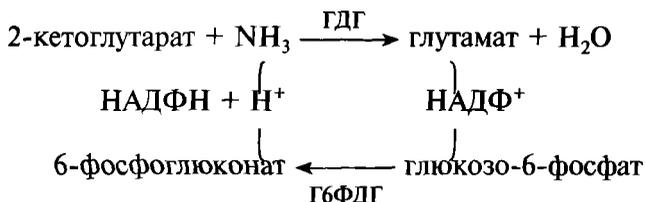
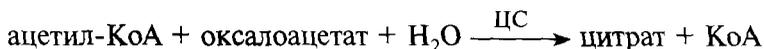
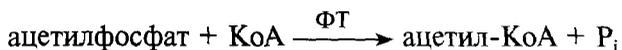
$$[S]_0 = \frac{-\Delta[S]}{e^{-k_1 t_1} - e^{-k_1 t_2}} \quad (24)$$

Если известна константа k_u находят изменение концентрации за период времени $\Delta t = t_2 - t_x$, из чего определяют величину $[S]$. При этом в каждом измерении интервал $t_2 - t_x$ должен быть одним и тем же. В соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен условия реакции первого порядка выполняются лишь при низкой концентрации субстрата ($[S] \ll K_M$). Следовательно, количество определяемого таким методом субстрата должно быть относительно небольшим. В противном случае константа Михаэлиса должна быть высокой. Данное условие можно выполнить путем добавления конкурентного ингибитора, в присутствии которого повышается кажущаяся константа Михаэлиса. Примером определения концентрации субстрата кинетическим методом является определение глюкозы путем сопряжения глюкозооксидазной и пероксидазной реакций.

3.5.4 Циклические ферментативные процессы

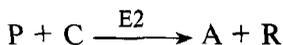
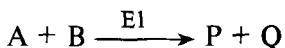
С помощью циклического процесса можно определять очень низкие концентрации метаболитов. В данном методе определяемый метаболит является промежуточным продуктом в последо-

вательности реакций и его концентрация остается постоянной. Примером метаболита, находящегося в клетке в очень низкой концентрации, может служить кофермент А. Он может образовываться из ацетилфосфата под действием фосфотрансферазы (ФТ). В сопряженной индикаторной реакции малатдегидрогеназа (МДГ) поставляет оксалоацетат для образования цитрата под действием цитратсинтазы (ЦС):



В данном случае образование НАДФН не может являться индикаторной реакцией, так как его концентрация в системе постоянна. Поэтому реакция останавившаяся в равновесии не может служить индикатором. Однако, если в системе, в которой протекает ферментативный процесс, концентрация фосфогенерации НАДФН, можно фосфогенерации, контролировать реакцию, катализируемую глутаматдегидрогеназой (ГДГ) и оксалоацетатом (ОА) и цитратсинтазой (ЦС). Поскольку концентрация анализируемого промежуточного продукта остается постоянной в процессе реакции, его можно рассматривать в качестве катализатора.

В общем виде циклический ферментативный процесс можно записать следующим образом:



Суммарная реакция выглядит так:



A — это то вещество, которое нужно определить: косубстрат или кофермент. Его концентрация должна быть лимитирующей и быть ниже значения $K_{M'}^A$ в то время как концентрации субстратов B и C должны быть высокими. Активность обоих ферментов E1 и E2 также должна быть высока. Если в данной циклической системе достигается стационарное состояние, то скорость образования P должна быть равна скорости обратной реакции, т.е. скорости образования A:

$$k_1[A] = k_2[P]$$

Константа скорости реакции первого порядка k для суммарной реакции определяется уравнением

$$k = \frac{V_{\max}}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2}$$

F_{\max} — это скорость реакции при насыщающей концентрации вещества A. Константа скорости всего циклического процесса $k_{\text{цикл}}$ определяется выражением

$$k_{\text{цикл}} = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2}$$

Литература

- Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schultz, D.W., Rock, M.K. (1961) / *Biol. Chem.* 236, 2746-2753
- Anggard, E., Satnelsson, B. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3rd edn. Bergmeyer, H.U., ed. pp. 1925-1933, Verlag Chemie, Weinheim
- Bergmeyer, H.U. (1977) *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim
- Passonneau, J.V., Lowry, O.H. (1978) in *Principles of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U., ed. pp. 86-87, Verlag Chemie, Weinheim
- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim
- Copeland, R.A. (2000) *Enzymes, a Practical Approach to Structure, Mechanism and Data Analysis*, 2nd edn. Wiley-VCH, New York

3.6 МЕТОДЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО АНАЛИЗА

Одним из основных критериев при выборе метода анализа для того или иного ферментативного процесса, безусловно, является простота проведения анализа. Далее предпочтение отдается

тем методам, которые позволяют осуществлять непрерывный мониторинг процесса. Метод должен быть достаточно чувствительным и, естественно, должно быть доступно соответствующее оборудование. В данном разделе мы обратимся к рассмотрению приборов и инструментов, наиболее часто использующихся в ферментативном анализе. Поскольку описание таких приборов можно найти во множестве учебников, особое внимание мы уделим аспектам, которые важны именно для ферментативного анализа, а также обсудим наиболее распространенные методы. Как уже упоминалось, ферментативный анализ часто построен таким образом, что реакцию останавливают через определенный промежуток времени и проводят количественное определение содержания продукта или субстрата. Это можно сделать непосредственно, например, путем хроматографического разделения смеси и идентификации ее компонентов (ВЭЖХ или масс-спектрометрия), либо путем химической модификации анализируемого вещества с помощью красителя или другого реагента, в результате чего становится возможным применение определенного аналитического метода детекции. Второй подход не часто применяется в ферментативном анализе, поэтому мы не рассматриваем его в данной книге.

3.6.1 Спектральные методы

3.6.1.1 ФОТОМЕТРИЯ В УФ/ВИДИМОМ ДИАПАЗОНЕ

Фотометрический метод детекции наиболее часто используется в ферментативном анализе главным образом благодаря своей высокой точности, простоте исполнения, умеренной стоимости и широким возможностям соответствующих приборов. Существует большое разнообразие фотометров, так что иногда бывает трудно выбрать наиболее подходящий прибор. Если нет финансовых ограничений, можно купить универсальный спектрофотометр, снабженный множеством дополнительных устройств, однако таким прибором пользоваться сложнее, чем простым инструментом с ограниченным количеством функций.

Внедрение микропроцессоров практически во все сферы жизни не обошло и фотометрическую технику (да и почти все аналитические приборы), что дало не только ряд преимуществ, но и создало определенные сложности. Принцип действия фотометра прост — он определяет, насколько интенсивность падающего света ослабевает при прохождении через анализируемый раствор,

и качество прибора зависит главным образом от качества оптики — линз, решеток и фотоумножителя. К сожалению, иногда производители больше внимания уделяют программному обеспечению, разобраться в котором порой гораздо сложнее, чем в принципах действия самого прибора. Это не только усложняет работу на приборе, но и затрудняет выбор инструмента. Возможно, скоро эта тенденция пройдет и производители вновь больше внимания будут уделять действию самого прибора.

Иногда различают абсорбционные методы, основанные на использовании коэффициента поглощения, и колориметрические методы, в которых интенсивность окраски анализируемого образца оценивают по калибровочной кривой для соответствующего красителя. Однако для реализации обоих методов может использоваться один и тот же инструмент.

Важными критериями для спецификации фотометров являются рабочий диапазон длин волн, возможность работать при фиксированной или переменной длине волны, монохроматичность излучения, а также путь луча (одиночный или расщепленный луч). Простейшие (и наиболее экономичные) приборы — это фильтровые фотометры, на которых обычно можно выбрать из спектра (например, ртутной лампы) отдельные длины волн с помощью соответствующих фильтров. Эти приборы характеризуются хорошей воспроизводимостью длины волны падающего света. Поскольку линии поглощения большинства веществ расположены в широком спектральном диапазоне, практически для всех случаев можно найти подходящий фильтр, даже если он не точно соответствует максимуму поглощения. Фотометры с фиксированной длиной волны обычно используют при проведении твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), они также чрезвычайно удобны в тех лабораториях, где проводят большое количество одинаковых рутинных измерений. Для различных условий проведения анализа существует программное обеспечение, так что работающий на приборе человек должен лишь выбрать соответствующий файл, а фотометр автоматически измеряет поглощение образцов и выдает результаты.

Хотя подобные устройства удобны для выполнения ряда задач, они имеют определенные ограничения. Фильтровые фотометры обычно работают в видимом диапазоне спектра, так что провести с их помощью измерение в УФ-диапазоне, например, для прямого определения концентрации белка не представляется возможным. То же самое можно сказать и о некоторых дешевых спектрофотометрах, рабочий диапазон которых ограничен види-

мой областью спектра. Преимуществом таких приборов является более экономное использование дорогих дейтериевых ламп, срок действия которых ограничен. В контролируемых с помощью компьютера самонастраивающихся приборах обычно автоматически включаются как галогенная лампа видимого света, так и ультрафиолетовая лампа, даже если в ней нет необходимости, так что она расходуется напрасно, если ее не отключить. Более того, некоторые приборы не могут настроиться без включения УФ лампы и даже в видимом диапазоне не могут работать без включенной УФ лампы.

Предпочтение следует отдавать приборам, способным работать во всем спектральном диапазоне. Общий принцип их действия показан на рис. 3.11. Эти спектрофотометры снабжены монохроматором и решеткой, от качества которой зависит разрешение прибора. Приборы более высокого качества обычно снабжены двухлучевой оптической системой детекции. В инструментах с двухлучевой системой один луч проходит сквозь раствор сравнения, а другой — сквозь образец. Фотоумножитель детектирует два луча отдельно и в качестве сигнала выдает разность поглощения образца и поглощения раствора сравнения. Преимуществом приборов такого типа является то, что показания для раствора сравнения не нужно вычитать из показаний для образца или принимать их за ноль, как это делается в однолучевых приборах. Усиливающиеся со временем спонтанные изменения поглощения, происходящие даже в растворе сравнения (дрейф нулевой

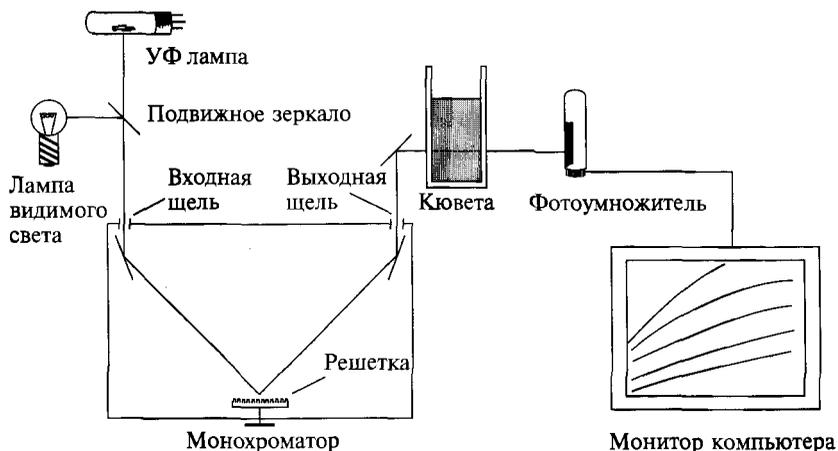


Рис. 3.11. Схема устройства спектрофотометра, работающего в УФ/видимой области

линии), учитываются автоматически, и спектрофотометр регистрирует лишь реакцию, происходящую в анализируемом образце. Перечисленные преимущества двухлучевых приборов могут показаться не такими уж значительными, но они действительно очень удобны при решении определенного ряда задач (например, в дифференциальной спектроскопии). Напротив, применение таких приборов для простых измерений может вызвать ряд проблем. В соответствии с основополагающим правилом оптики — законом Бугера-Ламберта-Бера — следует избегать высоких абсолютных значений поглощения, а к значениям выше единицы следует подходить с осторожностью. В однолучевом приборе высокое поглощение контрольного раствора может быть сразу обнаружено и ликвидировано, например путем разбавления. Однако в двухлучевой системе подобное явление может остаться незамеченным, поскольку прибор в качестве результата выдает разность поглощения образца и поглощения раствора сравнения, а не абсолютные значения поглощения. Поэтому в двухлучевой системе разброс показаний для раствора сравнения автоматически переносится на показания для анализируемого образца, в то время как в однолучевой системе поглощение раствора сравнения можно определить как среднее из нескольких измерений и вычесть его из показания для анализируемого образца. Даже при наличии дрейфа нулевой линии усредненные значения этих отклонений, полученные при повторных измерениях, могут быть более достоверными, чем результат, полученный вычитанием единственного контрольного значения из единственного значения для анализируемого образца.

Для большинства фотометрических измерений важна правильная запись результатов. Для простых анализов, выполненных методом остановки реакции или по одной точке, это не столь важно, так что численные значения можно сразу распечатывать или вручную списывать с дисплея. Для непрерывных измерений и спектров качество регистрации результатов гораздо важнее. Приборы с прямой аналоговой записью результатов обычно связаны с самописцем. Результаты фотометрических измерений регистрируются в виде изменения вольтажа, а самописец выступает в роли вольтметра, записывая относительное поглощение чернилами на рулоне специальной бумаги. Развертка бумаги по времени соответствует временной оси. Самописец обычно регулируют таким образом, чтобы максимальное отклонение стрелки самописца соответствовало величине поглощения, равной единице. Данная система хороша тем, что фотометрический сигнал может быть усилен простым изменением диапазона чувствительности

самописца. Например, если показание прибора 1 В соответствует поглощению 1,0, переключение самописца в диапазон 0,1 В приводит к десятикратному увеличению чувствительности без изменения настроек самого прибора. В таких условиях можно зарегистрировать даже очень медленные реакции. Понятно, что для таких случаев особенно важно иметь контроль с соответствующим нулевым значением, поскольку как сам инструмент, так и компоненты раствора могут производить спонтанное смещение нулевой линии.

Приборы, оборудованные компьютером, обычно запрограммированы таким образом, что автоматически настраиваются в соответствии с самым высоким и самым низким значением текущего измерения. Это кажущееся преимущество может вызывать некоторые проблемы. Если фотометр адаптируется к каждому конкретному измерению, то это затрудняет сравнение результатов отдельных измерений. Напротив, даже значительные различия, например, во временном течении различных реакций могут остаться незамеченными, поскольку в результате автоматического изменения параметров экрана прибора все кривые могут казаться одинаковыми. Чтобы избежать ошибок, следует внимательно анализировать различия в величинах поглощения. Еще одним недостатком приборов такого рода является то, что такие параметры, как значение нулевой точки, диапазон значений поглощения и время измерения нужно задавать до проведения измерения. Например, если установленное время реакции 10 мин и если в результате влияния каких-то специфических добавок реальные значения поглощения выпадают из заданного заранее диапазона, то реакция будет продолжаться 10 мин, но на экране ничего не будет видно. Конечно, после окончания измерений кинетическую кривую можно вывести на экран, но в процессе реакции ничего сделать нельзя; в то же время в простых фотометрах всегда можно изменить параметры самописца в процессе измерения. Очевидным преимуществом оборудованных компьютером приборов является возможность представить результаты каждого измерения в виде отдельного файла, сохранить их или перенести на другой компьютер для дальнейшей работы. Программное обеспечение к фотометрическим приборам обычно позволяет сразу определить скорость реакции, обработав результаты методом линейной регрессии. Однако нужно быть уверенным, что исследуемая реакция подчиняется определенным законам. Например, для использования уравнения Михаэлиса-Ментен

необходимо ограничиваться начальными скоростями реакции, что далеко не всегда заложено в программу, а должно контролироваться самим исследователем. Кроме того, нужно следить, чтобы на проведение регрессионного анализа не повлияли такие артефакты, как, например, изменение пути луча.

Расположение кювет в приборе особенно важно для больших серий экспериментов и рутинных измерений. Кюветное отделение должно иметь отдельные ячейки по крайней мере для раствора сравнения и для образца, чтобы при продолжительных измерениях время от времени можно было бы корректировать нулевое значение. Кюветное отделение с большим количеством ячеек позволяет параллельно анализировать несколько образцов, особенно это удобно, если имеется автоматический переключатель ячеек. Это значительно экономит время, однако следует обращать внимание на точность выполнения каждого отдельного теста. Для анализа большого количества образцов, а также в тех случаях, когда необходима высокая точность измерений, можно порекомендовать использовать автоматический анализатор для ELISA, позволяющий экономить время и реактивы.

В дополнение к основной схеме устройства фотометров, позволяющих производить измерения в УФ/видимом диапазоне спектра, существует множество специальных устройств, но мы не можем упомянуть о каждом из них отдельно в этой книге. Поскольку ферментативные реакции чрезвычайно чувствительны к изменениям температуры, измерения следует производить при постоянном температурном режиме, для чего используются специальные термостатируемые кюветные отделения. Далее, необходимо проверить, что луч фотометра проходит через центр кюветы, особенно это важно при использовании кювет малого объема, позволяющих сократить расход реактивов. Если пучок света слишком широк, следует использовать кюветы с черными стенками. Кроме того, кювета должна быть достаточно заполнена, чтобы луч света не задевал мениска. Понятно, что стеклянные кюветы можно использовать лишь для измерений в видимом диапазоне, тогда как для измерений в УФ области нужны дорогие кварцевые кюветы. Для серий измерений можно применять пластиковые кюветы; они не бьются и могут использоваться несколько раз. Существуют пластиковые кюветы для измерений в УФ области, но их пригодность следует проверять, особенно при работе в дальней УФ области (рис. 3.12). Недостатком пластиковых кювет являются их плохие теплообменные свойства.

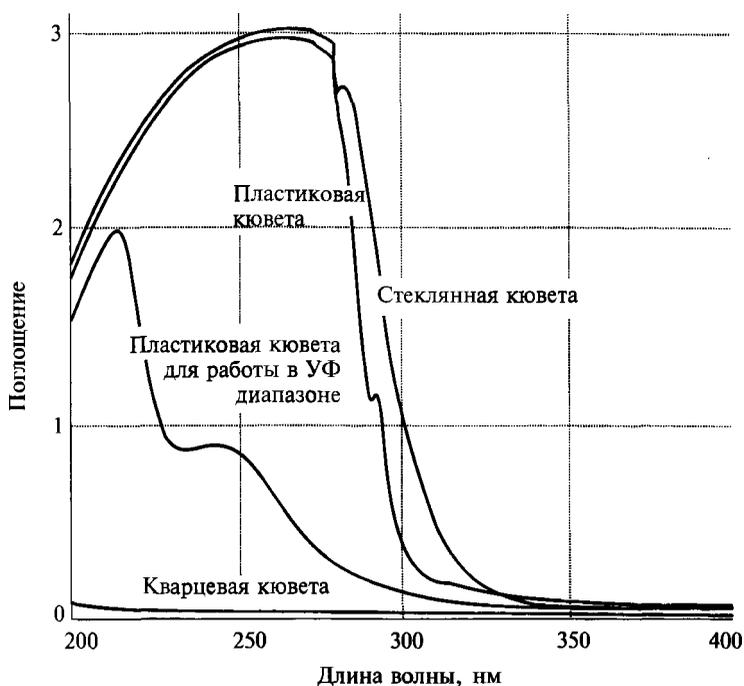


Рис. 3.12. Спектральные свойства кювет, изготовленных из разных материалов

Спектр применений фотометрических приборов в биохимической лаборатории огромен. На определении поглощения основаны практически все тесты, связанные с анализом белков, а также нуклеиновых кислот, липидов, углеводов и фосфатов. Огромное большинство методов ферментативного анализа связано с измерением поглощения. В этой связи (а также в связи с другими методами анализа) следует различать два основных подхода:

- 1) Определение собственного поглощения вещества.
- 2) Использование хромофоров (колориметрическое определение).

Поскольку практически все вещества обладают способностью поглощать свет, по крайней мере в ультрафиолетовой области спектра, все они могут быть обнаружены на основании этого свойства. Однако именно в связи с этим фактом большинство полос поглощения неспецифичны и не являются характеристикой одного конкретного вещества. При анализе ферментативных реакций важно не само поглощение, а разница между поглощением субстрата и продукта. Примером может служить пара

НАД/НАДН — только НАДН имеет характерную полосу поглощения при 340 нм (рис. 3.13). Однако такое различие в спектральных свойствах субстрата и продукта встречается не так часто. Если подобного различия нет, после проведения реакции оставшийся субстрат или образовавшийся продукт можно химическим путем превратить в окрашенное производное или связать с хромофором. В некоторых ферментативных методах анализа, в частности с протеазами, субстрат ковалентно связывают с хромофорной группой, например с и-нитрофенолом. В процессе ферментативной реакции эта связь разрывается, а высвобождающийся хромофор проявляет иные спектральные свойства, чем связанный, например окрашивает раствор в интенсивный желтый цвет. Похожий принцип лежит в основе метода Брэдфорд, использующегося для определения концентрации белка: максимум поглощения хромофора изменяется при связывании белка.

Для того чтобы понять принцип фотометрии, нужно помнить, что, несмотря на свое название, абсорбционный фотометр на самом деле измеряет пропускание света, т.е. снижение интенсивности падающего света I_0 до интенсивности I при прохождении через кювету с раствором:

$$I/I_0 = e^{-\epsilon cd} \quad (25)$$

где a — длина оптического пути, c — концентрация анализируемого вещества, ϵ — коэффициент поглощения (моль⁻¹ см⁻¹) — константа, характеризующая конкретное вещество. Интенсивность падающего света I_0 определяется как общая интенсивность света (100%)

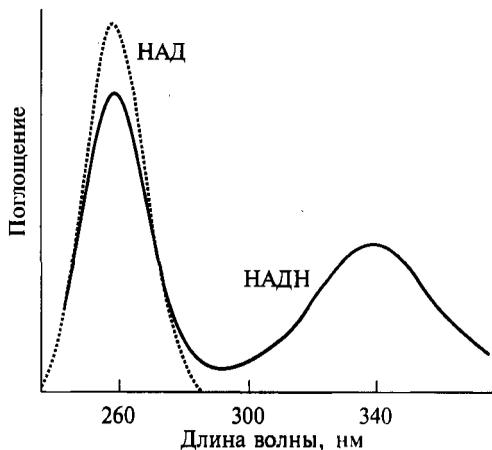


Рис. 3.13. УФ-спектры окисленного и восстановленного НАД

в данных условиях, т. е. при определенном устройстве прибора, доле света лампы, попадающей на образец, длине оптического пути, устройстве монохроматора, ширине пучка, чувствительности фотоумножителя, выбранной длине волны и конкретном растворе сравнения в кювете; интенсивность света при полностью перекрытом оптическом пути принимается за 0%. На определении отношения I/I_0 , основано проведение количественных расчетов, а значение отношения не зависит от специфических условий и типа прибора. Неудобная для использования экспоненциальная зависимость преобразуется в линейную форму, превращаясь в хорошо известный закон Бугера-Ламберта-Бера, в котором отрицательный логарифм пропускания заменен на поглощение A :

$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon cd \quad (26)$$

Большинство фотометров позволяют определять как пропускание, так и поглощение. Приборы старого образца нужно калибровать вручную, выставляя 0% (путь луча перекрыт) и 100% пропускания (путь открыт) перед проведением измерений. Современные приборы выполняют эту процедуру автоматически.

Литература

- Cantor, C.R., Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman, New York
 Harris, D.A., Bashford, C.L. (1987) *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*, IRL Press, Oxford
 Chance, B. (1991) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 1-28

3.6.1.2 ТУРБИДИМЕТРИЯ

Падающий свет рассеивается, проходя сквозь суспензии, эмульсии и коллоидные растворы (эффект Тиндаля). Это явление используется для анализа ферментативных процессов, в которых фермент действует на полимерный субстрат, как это имеет место при гидролизе клеточной стенки бактерий под действием лизоцима, при гидролизе целлюлозы целлюлазами или при действии липаз на жировые эмульсии. При этом можно измерять два разных параметра — ослабление интенсивности падающего света (турбидиметрия) или интенсивность рассеянного света (нефелометрия). Хотя созданы специальные приборы для проведения турбидиметрического анализа, его можно осуществить на обычном фотометре, а вот для проведения нефелометрии необходим флуориметр (см. ниже). Для турбидиметрического анализа важна конфигурация фотометра, особенно расположение

и объем кюветы, а также ширина щели. Если кювета расположена далеко от фотоумножителя, в основном регистрируется падающий свет, а если близко — в значительной степени регистрируется рассеянный свет. Рассеяние практически не зависит от длины волны падающего света, так что для измерений можно выбрать длину волны в середине спектрального диапазона, например 450 нм. Для калибровки обычно используют стандартную суспензию, например суспензию формазина.

3.6.1.3 ФЛУОРИМЕТРИЯ

По сравнению с абсорбционными методами флуоресцентный анализ имеет более высокую чувствительность (более чем в 100 раз), но на результаты анализа влияет множество различных факторов, кроме того, необходимо достаточно дорогое оборудование и значительный опыт работы. Дополнительная сложность связана с необходимостью соблюдать максимальную чистоту экспериментальных условий и использовать очень чистые реагенты. И, наконец, наиболее серьезным ограничением для применения данного метода является тот факт, что лишь некоторые вещества (флуорофоры) способны испускать свет. Согласно теории, когда молекула поглощает фотон, один из ее электронов переходит на более высокий энергетический уровень, а сама молекула переходит в возбужденное состояние. При возвращении молекулы в основное состояние происходит испускание света. В результате энергетических потерь испускаемый свет всегда имеет большую длину волны, чем поглощенный свет. Необходимым условием для испускания света является сохранение возбужденного состояния на протяжении определенного конечного периода времени (несколько наносекунд). Это условие выполняется лишь для небольшого числа соединений, главным образом тех, что содержат ароматические или гетероциклические группы, а в большинстве других веществ возбужденное состояние мгновенно дезактивируется в результате каких-то иных процессов.

Среди природных веществ и метаболитов лишь немногие, подобно флавинам, имеют характерный спектр испускания; этим свойством обладают некоторые аминокислоты, в частности триптофан, так что все содержащие триптофан белки флуоресцируют. Нуклеиновые кислоты, нуклеозиды и нуклеотиды (АМФ, АТФ и др.), а также НАД(Ф) не обладают этим свойством, а вот НАД(Ф)Н испускает свет. Это используется в некоторых чувствительных ферментативных методах анализа дегидрогеназ и в со-

ответствующих сопряженных методах анализа. Кроме названных веществ, лишь некоторые метаболиты, такие как антраниловая кислота, желчные кислоты, а также зеленый флуоресцентный белок испускают свет. Для более широкого применения флуоресцентного метода используют искусственные флуорофору, такие как широко применяемый в клеточной биологии флуоресцеин.

Особенностью флуоресценции является сильная зависимость спектров испускания, особенно интенсивности и положения максимума пика излучения, от полярности ближайшего окружения молекулы. При ковалентном или нековалентном связывании с другими веществами (например, субстратами), а также с макромолекулами (например, ферментами) спектр флуоресценции вещества сильно изменяется. В качестве примера приведем умбеллиферон (7-гидроксикумарин): связанный с липидным или углеводным субстратом он используется в ферментативном анализе для прямой флуориметрической детекции расщепления субстрата. Поскольку далеко не всегда фермент способен взаимодействовать с сильно модифицированным субстратом, флуориметрический метод детекции довольно редко используется в ферментативном анализе. Однако он может применяться для анализа конформации белков и связывания лигандов.

Принцип устройства флуориметров аналогичен принципу устройства фотометров, но существует несколько характерных отличий (рис. 3.14). Для возбуждения молекул требуется более высокая интенсивность света, чем используется для измерений поглощения, а спектральный диапазон должен быть уже — он включает в себя УФ и ближнюю видимую область спектра (200–500 нм). В связи с этим в таких приборах используется только один тип ламп — обычно ксеноновая дуговая лампа. Интенсивность испускаемого ею света сильно ослабевает при удалении от центра указанного диапазона, так что в дальней УФ области (200–250 нм) достигается сравнительно слабое возбуждение.

Поскольку испускание света предполагает предварительное поглощение света (возбуждение), существуют два типа спектров флуоресценции. Спектр возбуждения флуоресценции совпадает со спектром поглощения флуорофора, а спектр испускания отражает особенности его флуоресценции. Для мониторинга обоих типов спектра нужны два независимых монохроматора: монохроматор возбуждения располагается перед кюветой, а монохроматор испускания — за ней. Поскольку детектировать нужно лишь флуоресцентное излучение флуорофора в кювете, а не свет от источника возбуждения, луч испускаемого флуорофором света должен быть

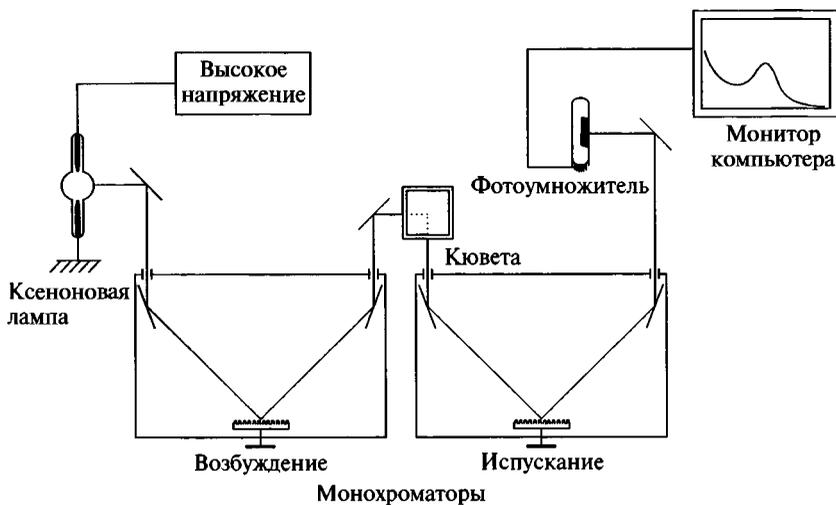


Рис. 3.14. Схема устройства флуориметра

направлен под прямым углом по отношению к лучу возбуждающего света, следовательно, кювета должна быть светопроницаема со всех четырех сторон (кюветы для измерения поглощения обычно имеют две непрозрачные стороны, за которые можно брать рукой). В связи с этим с такими кюветами следует обращаться особенно осторожно, стараясь избегать любого загрязнения их поверхности. После прохождения монохроматора испускания луч света попадает в фотоумножитель, где он детектируется таким же образом, как это происходит при измерении поглощения, с той лишь разницей, что во флуориметрах используются гораздо более чувствительные фотоумножители, поскольку интенсивность испускаемого света низкая.

Для упрощения работы на флуориметре и для его удешевления монохроматор возбуждения или даже оба монохроматора могут быть заменены фильтрами, как в случае абсорбционных фотометров. В большинстве анализов достаточно определить общую интенсивность испускаемого света. Но поскольку интенсивность падающего света намного превосходит интенсивность испускаемого света, необходимо полностью исключить вклад падающего света в испускаемый свет. Для этого падающий свет захватывается специальным светопоглощающим покрытием. Однако значительная часть света рассеивается кюветодержателем или поверхностью кюветы. Кроме того, рассеивающие свет частицы могут содержаться в самом анализируемом растворе, в резуль-

тате чего возникает релеевское рассеяние или эффект Тиндаля (в присутствии макромолекул); в растворе также могут находиться частицы пыли или пузырьки воздуха. Поскольку испускаемый свет всегда имеет большую длину волны, чем возбуждающий свет, рассеянный свет от источника возбуждения можно удалить при помощи фильтров (или монохроматора), причем тем эффективнее, чем сильнее различаются эти длины волн. Преимущество монохроматоров перед фильтрами состоит в их более высокой селективности.

Тот факт, что лишь немногие вещества способны флуоресцировать, можно рассматривать как преимущество метода, поскольку в большинстве анализов лишь используемый хромофор испускает свет. С другой стороны, на результаты измерений, особенно при высокой чувствительности анализа, влияют различные помехи, например уже упоминавшееся рассеяние света. Имеющие правильную форму рамановские спектры могут быть ошибочно приняты за спектры флуоресценции, однако их легко идентифицировать, поскольку рамановский спектр зависит от длины волны возбуждающего света и соответствующим образом смещается при изменении длины волны.

Различные факторы приводят к тушению флуоресценции. Любые примеси в кювете ослабляют излучение, а при высоких концентрациях компонентов и даже самого флуорофора может происходить тушение флуоресценции. Эффект внутреннего фильтра возникает в том случае, когда падающий свет поглощается не только флуорофором, но и каким-то нефлуоресцирующим веществом. Поэтому флуоресцентный анализ требует особой чистоты реагентов.

В то время как пропускание света связано с концентрацией поглощающего вещества экспоненциальным образом (в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера), интенсивность флуоресцентного излучения линейно зависит от концентрации флуорофора. Эта линейность является хорошим контролем чистоты эксперимента, так что все отклонения от линейности говорят о каких-либо нарушениях. Достоинством флуоресцентного анализа является его высокая чувствительность, но метод ограничен использованием низкой концентрации флуорофора, а при высоких концентрациях количественный анализ обычно осуществить невозможно.

Концентрация вещества связана с его поглощением через материальную константу — коэффициент поглощения ϵ , так что количественные расчеты можно провести непосредственно

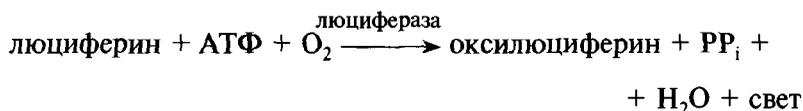
на основании измерения поглощения. В случае флуоресцентного анализа это невозможно. Квантовый выход флуоресценции является материальной константой, но, с одной стороны, его непросто определить, и поэтому он известен не для всех веществ, особенно если спектр флуоресценции изменяется в результате взаимодействия с другими веществами. С другой стороны, сигнал флуориметра является относительной величиной, которую нельзя напрямую сравнивать с сигналами, полученными на других приборах даже при идентичных условиях проведения эксперимента. Сигнал зависит от ряда факторов, в том числе от мощности лампы и геометрии прибора (от которой зависит доля излучаемого света, попадающая в фотоумножитель). Основным препятствием для стандартизации флуоресцентных сигналов является отсутствие определенного верхнего предела флуоресценции (аналогичного 100% пропускания), что связано с линейной зависимостью интенсивности флуоресценции от концентрации флуорофора. Для проведения количественного флуоресцентного анализа необходимо иметь калибровочные кривые, построенные с помощью стандартных веществ. Такие стандарты (например, сульфат хинина) должны демонстрировать стабильную флуоресценцию в том же спектральном диапазоне, что и анализируемое вещество.

Литература

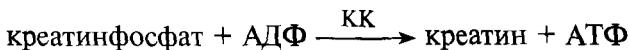
- Guibault, G.G. (1990) *Practical Fluorescence*. Marcel Dekker, New York
 Dewey, T.G. (1991) *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York
 См. также литературу к разделу «Фотометрия в УФ/видимом диапазоне».

3.6.1.4 ЛЮМИНОМЕТРИЯ

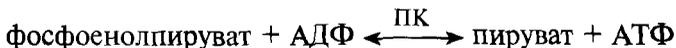
Люминесцентный анализ — один из наиболее чувствительных ферментативных методов; он основан на реакции, катализируемой люциферазой:



Именно эта реакция объясняет свечение светляков. В качестве субстрата люциферазы использует люциферин; максимум излучения приходится на 562 нм. Данная реакция используется для определения концентрации АТФ ниже $1 \cdot 10^{-15}$ М (см. разд. 3.7.4.17). Кроме того, эта реакция может быть частью сопряженных процессов, например, с креатинкиназой (КК):



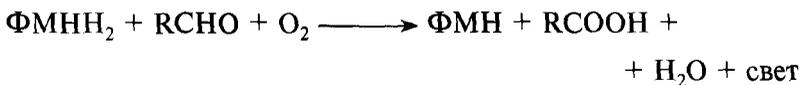
или пируваткиназой (ПК):



С помощью люциферазы из бактерии *Vibrio (Photobacterium) fischeri* можно определять НАД(Ф)Н в концентрации ниже 10^{-10} М. Первую реакцию в последовательности катализирует ФМН оксидоредуктаза (НДД(Ф)Н дегидрогеназа, КФ 1.6.8.1):



Следующую реакцию катализирует ФМН-зависимая алканаль-монооксигеназа (КФ 1.14.14.3):



Здесь RCHO — длинноцепочечный алифатический альдегид (8' 14 атомов углерода); максимум излучения приходится на 493 нм.

Биолюминесценцию можно детектировать с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика или флуориметра, однако лучше использовать специальный прибор — люминометр. Чувствительность люминометров примерно в 10^5 раз превышает чувствительность абсорбционных фотометров. Поскольку свет излучается в результате самой ферментативной реакции, источник света не нужен, так что фотоумножитель измеряет только свет, испускаемый образцом. Образец должен быть расположен близко к детектору (в других приборах этому не придается особого значения). Сигнал регистрируется в относительных световых единицах RLU (от англ. relative light units). Некоторые инструменты рассчитывают интенсивность излучения в фотонах в секунду. Световой выход прямо пропорционален концентрации лимитирующего вещества, например, концентрации АТФ в анализе с люциферазой. После запуска реакции импульсы света регистрируют на протяжении определенного времени, например 15 с. Выход света необходимо строго стандартизовать; он зависит от ряда факторов, особенно от объема реакционной смеси, который должен быть всегда одинаковым. Для стандартизации системы вместо кюветы с образцом в кюветное отделение помещают стабильный источник света. Это может быть определенный радиоактивный образец в сцинтилляционном коктейле или хемилюминесцентная реакция.

Литература

- Strehler, B.L. (1968) *Meth. Biochem. Analysis* 16, 99-179
Seitz, W.R., Neary, M.P. (1976) *Meth. Biochem. Analysis* 23, 161-188

3.6.1.5 ПОЛЯРИМЕТРИЯ

Некоторые ферментативные реакции, особенно с участием углеводов, сопровождаются изменением оптической активности. Примером может служить реакция, катализируемая инвертазой, — одна из первых изученных ферментативных реакций. Плоскополяризованный свет, проходя через раствор оптически активного вещества, изменяет плоскость поляризации. Это явление можно наблюдать с помощью поляриметра. Прежде чем попасть в кювету с анализируемым веществом, свет от источника поляризуется с помощью поляризационного фильтра (призмы Николя). При прохождении луча света через кювету его плоскость поляризации отклоняется от исходной ориентации. Степень вращения плоскости поляризации можно измерить с помощью второго поляризационного фильтра, называемого анализатором. Если анализатор ориентирован параллельно плоскости поляризации света (параллельно поляризационному фильтру в контроле без оптически активного вещества), весь свет проходит через него и попадает в фотодетектор. Если анализатор ориентирован перпендикулярно плоскости поляризации света, то свет через него не проходит совсем. Степень вращения плоскополяризованного света (α) зависит от природы вещества, его концентрации (c), длины оптического пути (l) и длины волны. Вращение сильнее при коротких длинах волн. Для разбавленных растворов используют длинные кюветы (с длиной пути 10 см). Обычно кюветы имеют цилиндрическую форму, в отличие от прямоугольных кювет для абсорбционной фотометрии. Удельное вращение $[\alpha]$ — это постоянная величина для каждого вещества, которая определяется как выраженное в градусах вращение раствора с концентрацией 1 г/мл в кювете с длиной оптического пути 10 см:

$$\alpha = [\alpha]lc \quad (27)$$

В поляриметрах простой конструкции вращение плоскости поляризации наблюдают глазом через трубку поляриметра. Анализатор вращают вручную, достигая максимальной интенсивности света, при этом положение фильтра соответствует углу вращения плоскости поляризации. Угол вращения определяют по положению анализатора. В современных спектрометрах, измеряющих

дисперсию оптического вращения (ДОВ), вращение плоскости поляризации света регистрируется автоматически в зависимости от времени и длины волны.

3.6.2 Электрохимические методы

3.6.2.1 рН-МЕТР

Зависимость скорости ферментативной реакции от рН — одна из важных особенностей ферментативного процесса. Для контроля рН, а также для приготовления буферов незаменимым инструментом в лаборатории является рН-метр. Существует множество типов рН-метров и рН-электродов. Наиболее важным критерием при выборе прибора является точность определения, но, кроме того, следует учитывать наличие автоматического контроля температуры и защитного пластикового корпуса (особенно это важно при использовании магнитной мешалки); если электрод имеет маленький диаметр, это позволяет проводить измерения непосредственно в кювете. Несмотря на то, что стеклянный электрод представляет собой стандартный электрод, состоящий из одной измерительной ячейки, не следует забывать принцип измерения рН — определение разницы потенциалов (электродвижущей силы E) между индикаторным электродом E_i и электродом сравнения E_s , которая прямо пропорциональна значению рН:

$$E = \{E_i + (RT/F) \ln a_{H^+}\} - E_s = (-59,16 \text{ мВ})\text{рН} - E_s \quad (28)$$

где R — универсальная газовая постоянная, F — постоянная Фарадея ($2,3026 \cdot 7 // \wedge = 59,16$ (при 25°C) — угол наклона кривой, т. е. изменение вольтажа, приходящееся на единицу рН), a_{H^+} — активность ионов водорода. В воде на поверхности стеклянного электрода создается тонкий слой геля, проницаемый лишь для ионов водорода (рис. 3.15). Прибор действует как вольтметр и измеряет разность потенциалов между стеклянным электродом и электродом сравнения, концентрическим образом закрепленным на его поверхности. Стеклянный электрод позволяет проводить измерения в диапазоне рН от 2 до 12. Электрод сравнения (за исключением тех, что содержат твердые или гелевые электролиты) необходимо время от времени заполнять раствором 3 М КС1 (23 г КС1 в 100 мл воды), а сам стеклянный электрод необходимо хранить в этом растворе. С особым вниманием надо следить за состоянием диафрагмы электрода сравнения, посредством которой осуществляется контакт между электродом сравнения

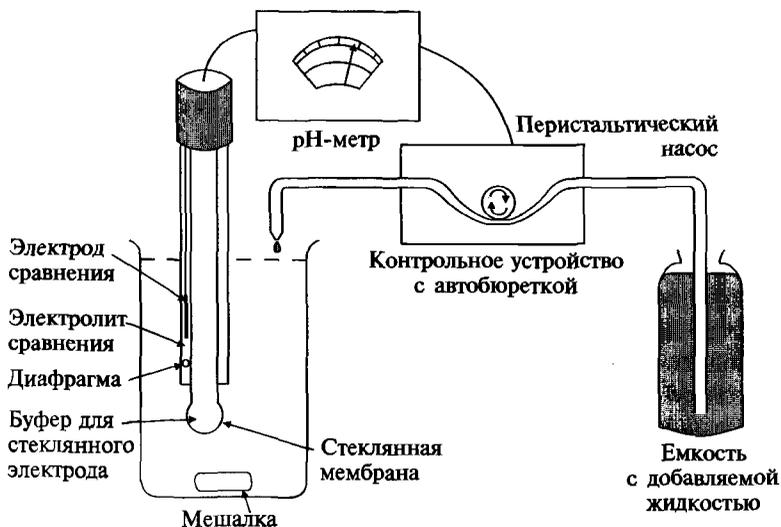


Рис. 3.15. Стеклянный электрод с единственной измерительной ячейкой, соединенный с рН-метром и рН-статом

и анализируемым раствором. При контакте с раствором белка диафрагма забивается. Ее можно очистить путем обработки ультразвуком или быстрым погружением в кислый или щелочной раствор. Кроме того, рекомендуется обработка пепсином (0,5 г в 100 мл 0,4%-ной HCl) на протяжении нескольких часов.

Прежде чем производить измерения рН, следует откалибровать прибор (не забывая следить за температурой) сначала с помощью буферного раствора с рН 7,0 (нулевая точка, при рН 7,0 стеклянный электрод обычно имеет нулевой потенциал), а затем с помощью кислого или щелочного буфера (рН 4,0 или 9,0), чтобы скорректировать угол наклона калибровочной кривой.

Точность измерений рН зависит главным образом от стеклянного электрода и обычно лежит в диапазоне 0,03-0,05 единиц рН. Однако этот параметр также зависит и от внешних факторов, таких как температура раствора, точность приготовления калибровочных буферов, состояние диафрагмы и электролита.

При нормальных условиях работы стеклянный электрод может служить от одного до трех лет. Старение электрода выражается в увеличении времени отклика и снижении наклона калибровочной кривой в щелочной области. Процесс калибровки становится все более сложным. Можно попытаться регенерировать стеклянный электрод, выдержав его 5 мин в 4%-ном NaOH , а затем в 4%-ной HCl .

3.6.2.2 рН-СТАТ

Фотометрические и колориметрические методы детекции практически вытеснили из аналитических методов рН-стат, хотя это устройство позволяет следить за ходом ферментативной реакции в непрерывном режиме. К сожалению, рН-стат имеет довольно сложное устройство и может применяться лишь для решения нескольких практических задач, так что он не входит в перечень стандартного лабораторного оборудования. С помощью рН-стата можно следить за ходом реакций, сопровождающихся изменением рН. Подобные изменения в принципе можно наблюдать с помощью обычного стеклянного электрода, но поскольку ферменты крайне чувствительны к изменению рН, непрерывное изменение рН в процессе реакции приводит к изменению ферментативной активности, так что постоянные условия проведения эксперимента поддерживать не удается. Преимущество рН-стата состоит в том, что он позволяет осуществлять непрерывный мониторинг изменений рН при сохранении рН в реакционной среде.

Центральной частью этого прибора является стеклянный электрод, соединенный с рН-метром, который выступает в роли контрольного устройства автотитратора (рис. 3.15). Изменение рН в растворе дает сигнал титратору добавить раствор кислоты или щелочи до восстановления исходного значения рН. Количество добавленного реагента регистрируется как функция времени. В результате рН в реакционной среде остается постоянным и не влияет на ход процесса. В качестве примеров ферментов, активность которых можно определить с помощью рН-стата, назовем липазу и холинэстеразу.

3.6.2.3 ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

Окислительно-восстановительные реакции, протекающие с участием пар НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н, ФАД/ФАДН₂ или Fe²⁺/Fe³⁺ в цитохроме (так называемые редокс-пары) можно изучать потенциометрическим методом. Определяют разность потенциалов между измерительным (платиновым) электродом и электродом сравнения. Нулевым потенциалом считают стандартный потенциал водородного электрода — платинового электрода, погруженного в раствор 1,228 М НС1. Для изменения окислительно-восстановительного состояния редокс-пар можно использовать восстанавливающие или окисляющие реагенты.

3.6.3 Реакции, протекающие с выделением или поглощением газа

3.6.3.1 АППАРАТ ВАРБУРГА

Во многих ферментативных реакциях принимают участие газообразные вещества: кислород в реакциях оксидоредуктаз, диоксид углерода в реакциях карбоксилаз или декарбоксилаз, азот в реакциях нитрогеназ. Существует несколько методов детекции связывания или высвобождения газа в ходе ферментативной реакции. Разработанный Отто Варбургом манометрический метод — это один из наиболее старых и универсальных методов, который подходит для детекции как связывания, так и высвобождения всех типов газов. Метод основан на определении изменения объема газа над реакционным раствором. Понятно, что устройство для точных измерений должно быть абсолютно герметичным; кроме того, измерению не должны мешать изменения температуры. Все это учтено в аппарате Варбурга. Прибор состоит из реакционного сосуда в форме небольшой колбы Эрленмейера с цилиндрическим отделом в центре и грушевидным отделом сбоку. Эти отделы необходимы для хранения компонентов — реакционной среды, фермента и субстрата — до начала реакции. Реакционный сосуд герметично присоединен к манометрической системе, заполненной голубым раствором (раствором Броди). Чтобы начать реакцию, реакционную емкость переворачивают, в результате чего все компоненты смешиваются. В процессе реакции реакционную емкость аккуратно встряхивают в термостатируемой водяной бане. Через определенный промежуток времени реакцию можно остановить, нпуская стоп-раствор из бокового отдела в реакционную смесь. Это, кроме того, приводит к высвобождению оставшегося растворенного газа (для высвобождения CO_2 используют кислоту). Объем газа, образовавшегося (или поглощенного) в процессе ферментативной реакции, определяют по изменению уровня манометрической жидкости. При поглощении газа прежде чем закрыть аппарат, его заполняют соответствующим газом.

Литература

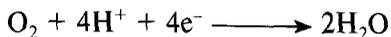
Warburg, O., Kubowitz, F. (1929) *Biochem. Z.* 214, 7-18

3.6.3.2 РАДИОАКТИВНАЯ МЕТКА

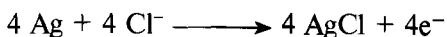
Хотя аппарат Варбурга вполне пригоден для анализа всех реакций, происходящих с выделением или поглощением газа, этот метод постепенно был вытеснен другим, более точным методом, который в меньшей степени подвержен влиянию внешних условий. За высвобождением углекислого газа можно следить с помощью радиоактивной метки. Соответствующий атом углерода в субстрате должен быть заменен изотопом ^{14}C (например, С₁ в молекуле пирувата для пируватдекарбоксилазной реакции). Реакцию проводят в газонепроницаемом сосуде и останавливают добавлением кислоты. Выделяющийся $^{14}\text{CO}_2$ абсорбируется на фильтре, смоченном щелочным раствором, например гиамином. Затем фильтр помещают в сцинтилляционный раствор и определяют радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика. Серьезным недостатком метода является необходимость работать с радиоактивной меткой, в частности, в случае неосторожности при вдыхании $^{14}\text{CO}_2$ долгоживущий изотоп углерода попадает в организм.

3.6.3.3 ЭЛЕКТРОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

Для измерения концентрации кислорода и углекислого газа были созданы специальные электроды. Кислородный электрод, разработанный Л. Кларком в 1953 г., состоит из платиновой проволоочки (катод), заключенной в стеклянную трубку. Рядом размещается электрод из серебра/хлорида серебра (анод), и вместе они погружены в насыщенный раствор хлорида калия. Между электродами устанавливается постоянное напряжение от 0,5 до 0,8 В. Анализируемый раствор с помощью шприца помещают в герметично запаиваемую ячейку электрода через специальное отверстие. Образец отделен от самого электрода тефлоновой мембраной. Кислород из раствора проникает сквозь мембрану и восстанавливается на катоде:



На аноде происходит окисление серебра:



Образующийся при этом ток пропорционален концентрации кислорода. Поскольку газ должен диффундировать через мемб-

рану, время отклика электрода довольно велико — до нескольких минут. При построении калибровочной кривой для количественного анализа используют полностью освобожденный от кислорода раствор (что достигается путем продувания азота) и насыщенный кислородом раствор.

Электрод для определения углекислого газа напоминает стеклянный рН-электрод с внешним резиновым или силиконовым покрытием. При погружении электрода в раствор образца растворенный углекислый газ проходит сквозь покрытие и превращается в угольную кислоту. Происходящее при этом изменение рН связано с концентрацией CO_2 в растворе:

$$\Delta\text{pH} = S\Delta\log p\text{CO}_2$$

где I — постоянная величина. Измерения концентрации CO_2 требуют строгого контроля рН. Для проведения количественного анализа можно использовать стандартные растворы гидрокарбоната или известные значения парциального давления.

Литература

- Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z. (1953) /. *Appl. Physiol.* 6, 189-193
Lessler, M.A., Bierley, G.P. (1969) *Meth. Biochem. Analysis* 17, 1-29
Beechey, R.B., Ribbons, D.W. (1972) *Meth. Microbiol.* 6B, 25-53
Nicolls, D.G., Garland, P.B. (1972) *Meth. Microbiol.* 6B, 55-63

3.7 ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ

3.7.1 Общие замечания

В принципе приведенные в последующих разделах книги методы ферментативного анализа применять довольно просто. Необходимое для проведения анализа оборудование описано ранее. Однако ферментативные системы являются весьма сложными, так что если какой-либо метод не работает сразу, может оказаться полезным учесть некоторые описанные ниже «подводные камни».

Такие *тривиальные причины* неудачи, как ошибка в выборе раствора или его концентрации, неправильное проведение процедуры или неполадки в работе прибора необходимо исключить сразу. Следует контролировать значения рН и температуры (некоторые компоненты раствора могут менять рН буфера!). Перед проведением фотометрического анализа необходимо определить поглощение раствора сравнения и анализируемого раствора до начала реакции. Поглощение смеси складывается из значений

поглощения отдельных компонентов, но, за исключением отдельных случаев (например, НАДН сам имеет высокое значение поглощения), высокое значение поглощения раствора сравнения может указывать на наличие какой-то ошибки. К значениям поглощения выше 0,5 следует относиться весьма критически, а значений выше 1,0 — избегать вовсе. Если компоненты реакционной смеси добавлять в кювету последовательно, можно найти тот из них, который имеет высокое значение поглощения, и проверить, не связано ли это высокое значение поглощения с наличием примеси, ошибочным выбором концентрации или другими причинами.

Активность ферментов зависит от множества различных факторов, в том числе от условий их выделения, условий и длительности хранения, конкретной закупленной партии фермента. Следовательно, оптимальное количество фермента для каждого анализа невозможно предсказать заранее, а следует определить в предварительных тестах. Если при проведении ферментативного анализа не удастся немедленно зафиксировать протекание реакции, иногда пытаются добавить дополнительное количество фермента, что чаще всего неправильно. При слишком высокой концентрации фермента превращение субстрата происходит настолько быстро, что никакой реакции нельзя увидеть вовсе. Добавление фермента лишь ухудшит ситуацию. Кроме того, важную роль играет время наблюдения. Реакция может протекать несколько секунд, несколько минут или даже несколько часов. Количество фермента, необходимое в этих случаях, различается по крайней мере в 100 раз.

Следует также обратить внимание на возможные изменения раствора сравнения, связанные с протеканием спонтанных реакций, нестабильностью компонентов, помутнением раствора или с другими причинами. Приведенные ниже примеры аналитических методов рассчитаны на небольшие объемы (для измерений в кюветках объемом 1-1,5 мл), что позволяет сократить расход реагентов и особенно ферментов. Для проведения фотометрического анализа необходимо, чтобы световой луч проходил через центр кюветы, что для небольших кювет возможно не на всех типах инструментов. В противном случае все объемы и количества реагентов необходимо увеличить в определенное количество раз и работать с обычными кюветками объемом 2,5-3 мл.

Приготовление растворов. Растворы для ферментативного анализа должны быть приготовлены тщательным образом. Поскольку

приготовление растворов отнимает определенное время и для проведения серийных анализов нужны идентичные растворы, следует приготовить сразу большие количества. Способ хранения раствора зависит от его состава, но для хранения растворов ценных веществ, таких как коферменты и субстраты, можно приготовить большие объемы (в приведенных ниже примерах рекомендуется готовить 10 мл раствора), разделить на отдельные порции (например, по 1 мл) и хранить в замороженном виде при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Растворы таких чувствительных веществ, как НАД(Ф)Н нестабильны при хранении даже в таких условиях, так что их каждый раз приходится готовить заново. Растворы неорганических солей и неорганические буферы хранятся долгое время даже без заморозки, но могут подвергаться микробному заражению. Ферменты хранят в виде концентрированных запасных растворов в соответствии с рекомендациями производителей. Если специальных указаний и опыта нет, следует опробовать несколько вариантов хранения, поскольку для всех ферментов общего правила не существует. Для длительного хранения можно предложить лиофилизацию или заморозку при температуре ниже $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, желательно в 20%-ном глицерине или в растворе БСА (1 мг/мл). В замороженном виде ферменты хранятся хорошо, но повторных процедур замораживания и оттаивания одного и того же образца следует избегать. Поэтому перед заморозкой ферментный препарат следует разделить на маленькие порции. Некоторые ферменты прекрасно хранятся в растворе сульфата аммония, особенно в виде кристаллической суспензии. Разбавленные растворы ферментов более чувствительны, и для их стабилизации можно добавить глицерин или 1 мг/мл БСА. В связи с этим разбавленные растворы ферментов следует готовить непосредственно перед проведением эксперимента.

В большинстве случаев реакционная смесь для ферментативной реакции содержит несколько компонентов: субстраты, кофакторы, важные ионы и консервирующие вещества. Чтобы избежать ошибок и разброса результатов, лучше приготовить большой объем такой смеси и брать необходимую аликвоту для каждого измерения, а не смешивать все компоненты заново для каждого измерения. Реакционная смесь должна содержать все компоненты, кроме того, который добавляют в последний момент для запуска реакции. Таким образом, для приготовления реакционной смеси в соответствии с приведенными ниже рекомендациями (из расчета 1 мл среды) количество компонен-

тов и объем среды нужно увеличить в несколько раз, например в 10 раз. Реакцию начинают, добавляя раствор субстрата или фермента. Некоторые ферменты лучше предварительно проинкубировать в реакционной среде в течение некоторого времени до начала реакции, в то время как другие могут при этом начать реагировать с отдельными компонентами среды или инактивироваться. Обычно реакционную смесь готовят не ранее, чем в день проведения эксперимента, и не хранят длительное время даже в замороженном виде.

Иногда возможны исключения из описанного выше правила приготовления реакционной смеси и рекомендован другой порядок действий.

Реакционную смесь не готовят заранее, а добавляют необходимые вещества прямо в кювету в том случае, если между компонентами существует несовместимость, какие-то компоненты нестабильны или если предполагается провести лишь небольшое количество измерений. При данном подходе можно варьировать порядок добавления реагентов и минимизировать взаимодействие между определенными веществами. Однако из-за использования различных пипеток и малых объемов реагентов могут пострадать точность и воспроизводимость измерений.

Приготовленная реакционная смесь не должна содержать компонента, используемого для запуска реакции (фермента, кофактора или субстрата). Если реакцию начинают добавлением субстрата или кофактора, то фермент входит в состав реакционной смеси, но в таком случае он может начать взаимодействовать с отдельными компонентами смеси. Это может играть положительную роль, однако следует обратить внимание на воспроизводимость условий предварительной инкубации. Возможно, все же лучше добавлять фермент непосредственно перед запуском реакции или запускать реакцию добавлением фермента.

В представленных ниже экспериментальных протоколах фермент добавляют в реакционную смесь в виде отдельной аликвоты (обычно в объеме 20 мкл). Скорость реакции напрямую связана с ферментативной активностью, так что количество добавляемого фермента нужно подобрать путем разведения или изменения его объема. Необходимо проводить измерение несколько раз (не менее трех), используя разные объемы раствора фермента (например, 5, 10, 20 мкл, доводя до одинакового объема буфером). Линейная зависимость между скоростью реакции и количеством фермента является показателем применимости метода.

3.7.2 Практические аспекты

В приведенных ниже протоколах под словом «вода» (H_2O) всегда подразумевается дистиллированная или деионизованная вода. Воду используют для разведения растворов. Практически все упоминающиеся в книге реагенты являются фирменными продуктами, поставляемыми такими фирмами, как Sigma-Aldrich, Пика, Merck (VWR Int.), Roche или Roth. Эти вещества могут существовать в виде солей, кристаллогидратов и др. Для наиболее часто применяемых форм приводятся значения относительных молекулярных масс M_x .

В большинстве случаев перед проведением анализа рекомендуется готовить реакционную смесь, содержащую в большом объеме (обычно в 10 раз превышающем необходимый объем) все необходимые компоненты, за исключением ферментов (кроме тех случаев, когда из-за нестабильности компонентов, протекания спонтанных реакций и др. требуется иной подход). До начала ферментативной реакции следует пронаблюдать за поведением этой смеси в качестве раствора сравнения на протяжении нескольких минут, пока не установится необходимая температура и не будут выявлены возможные отклонения нулевой линии. Реакцию запускают добавлением раствора фермента в объеме 0,01 или 0,02 мл. Такие объемы легко отобрать пипеткой и они не будут существенно изменять общий объем смеси. Понятно, что концентрацию фермента необходимо подобрать заранее. Обычно лучше использовать самую маленькую концентрацию фермента, достаточную для регистрации реакции. Например, 1 МЕ дегидрогеназы (например, ЛДГ) превращает 1 мкмоль НАДН в минуту, что соответствует изменению поглощения 6,3. Очевидно, что это слишком много. Одна сотая от этого количества (0,01 МЕ или 0,167 нкат) приводит к изменению поглощения 0,063 в минуту, что разумно. Таким образом, препарат ЛДГ с активностью 5000 МЕ/мл нужно развести буфером в 5000 раз, чтобы получить раствор с активностью 1 МЕ/мл. Если добавить 10 мкл этого раствора в 1 мл реакционной смеси, получится как раз необходимое разведение.

Приведенные ниже методики ферментативного анализа расположены в соответствии с классификационными номерами ферментов. При выборе той или иной методики автор пользовался целым рядом критериев с целью отразить все многообразие типов ферментов, часто используемых ферментов, таких как протеазы, алкоголь- и лактатдегидрогеназа, а также различных

методов детекции, таких как фотометрический, флуоресцентный или метод рН-статирования. Полное описание всех известных ферментативных методов анализа составило бы многотомное издание и, конечно, выходит за рамки данной книги.

3.7.3 Буферы и растворы

3.7.3.1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Ферменты активны и стабильны лишь в оптимальной области значений рН, так что даже временный сдвиг рН может привести к серьезным нарушениям их функции. В связи с этим для проведения ферментативных реакций необходимо использовать буферы. Зависимость состояния буферной системы от рН описывается уравнением Хендерсона-Хассельбалха, которое выведено на основании закона действующих масс для кислоты [Ac⁻] с константой диссоциации K_a :

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]}$$

Выразим отсюда концентрацию ионов водорода:

$$[\text{H}^+] = \frac{K_a[\text{HAc}]}{[\text{Ac}^-]}$$

В логарифмическом виде:

$$-\log[\text{H}^+] = -\log K_a - \log \frac{[\text{HAc}]}{[\text{Ac}^-]}$$

По определению выражение $-\log [\text{H}^+]$ представляет собой рН, а $-\log K_a = \text{p}K_a$. В конечном виде уравнение Хендерсона-Хассельбалха записывается следующим образом:

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[\text{HAc}]}{[\text{Ac}^-]} \quad (29)$$

Буфер используется для поддержания постоянного значения рН запасных растворов, разбавленного раствора фермента, а также при проведении реакции, которая может сопровождаться изменением рН, как в случае реакции дегидрогеназы или эстеразы. Кроме того, следует помнить, что некоторые вещества могут влиять на значение рН, находясь в кислой или основной форме. Следовательно, чтобы компенсировать все подобные влияния, следует использовать достаточно большую концентрацию буфера

либо перед внесением в реакционную смесь нейтрализовать те вещества, которые присутствуют в смеси в высокой концентрации. Обычно выбор рН буфера определяется рН-оптимумом фермента, но не следует забывать и о таких факторах, как стабильность фермента и состояние равновесия. Так, алкогольдегидрогеназную реакцию проводят при щелочном значении рН, что позволяет нейтрализовать выделяющиеся протоны и сместить равновесие реакции в желаемом направлении. Выбранное для реакции значение рН в значительной степени определяет выбор буфера. Учитывая, что достаточная буферная емкость сохраняется в пределах $pH_a \pm 1,5$, выбор подходящей буферной системы достаточно ограничен (см. табл. 3.3). Следующим важным критерием при выборе буфера является природа входящих в его состав катионов и анионов, поскольку некоторые из них могут влиять на состояние фермента. Некоторые одно- и двухвалентные ионы могут напрямую взаимодействовать с ферментами, приводя к их активации или ингибированию. Буфер может поставлять ферменту необходимый для активности катион или заменять уже связанный катион более или менее эффективным. Некоторые вещества, такие как фосфаты, способны образовывать комплексы и забирать у фермента важные для активности катионы. Возможно даже образование ковалентной связи между некоторыми компонентами буфера (такого как Трис) с аминокислотными остатками белковой цепи фермента. Таким образом, оптимальная буферная система определяется для каждого конкретного фермента отдельно. Следует обращать внимание как на активность фермента сразу после его разбавления, так и на его стабильность во времени. Для работы с биологическими образцами иногда рекомендуют использовать сложные и довольно дорогостоящие «биологические» буферы, такие как MOPS, HEPES или TES («буферы Гуда»), но часто вполне подходит простой калий- или натрийфосфатный буфер. На многие ферменты, в том числе и ферменты из термофильных организмов, ионы фосфата оказывают стабилизирующее действие (Stall & Blanchard, 1990; Good et al., 1966; Good & Izawa, 1972).

3.7.3.2 ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРОВ

Буферные растворы обычно готовят путем растворения рассчитанного количества соответствующего вещества сначала в небольшом объеме воды. Затем доводят рН раствора до нужного

Таблица 3.3. Некоторые биологические буферы с указанием значений р_f, и рН-диапазона при 25 °С

Краткое название	Полное название	р* _a	рН-диапазон
Ацетатный	-	4,76	3,9-5,6
Нитратный	—	4,76	3,9-5,6
MES	2-(N-морфолино)этансульфовая кислота	6,15	5,5-6,7
BIS-TRIS	бис(2-гидроксиэтил)иминотрис(гидрокси-метил)метан	6,5	5,8-7,2
ADA	^(2-ацетиамидо)-2-иминодиуксусная кислота	6,6	6,0-7,2
PIPES	пиперазин-М,?4'-бис(2-этансульфовая кислота)	6,88	6,1-7,5
ACES	N - (2-ацетиамидо)-2-аминоэтансульфовая кислота	6,9	6,2-7,6
MOPSO	3-(Ы-морфолино)-2-гидроксипропансульфовая кислота	6,9	6,2-7,6
BIS-TRIS-ПРОПАН	1,3- бис (трис [гидроксиметил!метиламино)-пропан	6,8	6,3-9,5
BES	М,М'-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфовая кислота	7,15	6,4-7,8
MOPS	3 - (N -морфолино)пропансульфовая кислота	7,2	6,5-7,9
P,	Фосфатный	7,21	6,5-8,0
TES	Ы-трис(гидроксиметил)мстил-2-аминоэтансульфовая кислота	7,5	6,8-8,2
HEPES	Н-(2-гидроксиэтил)пипсразин-№-(этансульфовая кислота)	7,55	6,8-8,2
DIPSO	3-(^М'-бис[2-гидроксиэтил]амино)-2-гидроксипропансульфовая кислота	7,6	7,0-8,2
MOBS	4-(N -морфолино)бутансульфовая кислота	7,6	6,9-8,3
ТАPSO	3-(М-трис[гидроксиметил]метиламино)-2-гидроксипропансульфовая кислота	7,7	7,0-8,3
TEA	триэтаноламин	7,8	7,3-8,3
POPSO	пиперазин-N, №-бис(2-гидроксипропансульфовая кислота)	7,85	7,2-8,5

Окончание табл. 3.3

Краткое название	Полное название	PK	pH-диапазон
HEPPSO	^(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'-(2-гидроксиэтил)пропансульфоновая кислота)	7,9	7,2-8,6
P.PPS (H EPPS)	N-2-гид роксипропан пиперазин-N'-3-пропансульфоновая кислота	8,0	7,3-8,7
TRIS	трис(гидроксиэтил)аминометан	8,1	7,0-9,0
TRICINE	N-трис(гидроксиэтил)метилглицин	8,15	7,4-8,8
Cily-амид	глицинамида гидрохлорид	8,2	7,4-8,8
HEPBS	^(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-4-бутансульфоновая кислота)	8,3	7,6-9,0
BI CINE	^N'-бис(2-гидроксиэтил глицин)	8,35	7,6-9,0
Gly-Gly	глицилглицин	8,4	7,7-9,1
TAPS	^трис(гидроксиэтил)метил-3-аминопропансульфоновая кислота	8,4	7,7-9,1
AMPD	2-амино-2-метил-1,3-пропандиол	8,8	7,8-9,7
TABS	^трис(гидроксиэтил)метил-4-аминобутансульфоновая кислота	8,9	8,2-9,6
AMPSO	3- [(1,1 -диметил-2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновая кислота	9,0	8,3-9,7
Воротный	-	9,23	8,5-10,0
CHES	2 -(N-циклогексиламино)этансульфонокислота	9,3	8,6-10,0
EA	этанолamina гидрохлорид	9,5	8,9-10,2
CAPSO	3-(циклогексиламино)-2-гидрокси-1-пропансульфоновая кислота	9,6	8,9-10,3
AMP	2-амино-2-метил-1 -пропанол	9,7	9,0-10,5
CAPS	2-(циклогексиламино) -1-пропансульфоновая кислота	10,4	9,7-11,1
CABS	4-(циклогексиламино)-1 -бутансульфоновая кислота	10,7	10,0-11,4

значения с помощью концентрированного раствора противоиона (HCl или NaOH) и доводят общий объем буфера до необходимого значения с помощью дистиллированной воды. Для описания буферной системы принято указывать концентрацию, щелочной и кислотный компонент и значение pH; само слово «буфер» обычно опускают, например, 0,1 М Трис-HCl pH 7,6. Калий- и натрийфосфатные буферы можно приготовить слиянием отдельно

приготовленных растворов K_2HPO_4 и KH_2PO_4 (или соответствующих натриевых солей) в конечных концентрациях, добиваясь необходимого значения pH. Поскольку значение pH зависит от температуры, готовить буфер следует при постоянной температуре (например, 25 °С). Если предстоит большой расход буфера, его можно приготовить более концентрированным и разбавлять по мере необходимости. Однако следует помнить, что pH зависит от концентрации компонентов, так что степень разбавления не должна быть слишком высока.

3.7.3.3 НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ И РАСТВОРЫ

Трис-НСl (трис(гидроксиметил)аминометан, A_{Γ} 121,14, pH 10,3-10,9), доводить 1 н. HCl.

Триэтаноламин гидрохлорид (M_{Γ} 185,7, pH 4,0-5,5), доводить 1 н. NaOH.

Триэтаноламин (M_{Γ} 149,2, pH 10,5), доводить 1 М HCl.

Натрийацетатный буфер можно приготовить двумя способами.

- 1) Разбавить рассчитанное количество ледяной уксусной кислоты сначала в небольшом объеме, довести pH с помощью 1 н. (или более концентрированного) NaOH и довести до конечного объема.
- 2) Приготовить отдельно растворы уксусной кислоты и ацетата натрия в необходимых конечных концентрациях и соединять их до достижения искомого значения pH.

Фосфатно-солевой буфер (ФСБ): 0,02 М фосфат натрия/калия pH 7,2, 0,9% NaCl. Буфер готовят растворением 1,09 г KH_2PO_4 , 2,14 г $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$ и 9,0 г NaCl в 1 л H_2O .

Для работы в более широком диапазоне pH (например, если необходимо определить pH-оптимум фермента) используют многокомпонентные буферные системы, как, например, *универсальный буфер* (*буфер Теорелла-Стенхагена*):

100 мл 0,33 М лимонной кислоты (моногидрат, M_{Γ} 210,1; 7 г в 100 мл H_2O);

100 мл 0,33 М фосфорной кислоты (85%, M_x 98,0; 2,2 мл в 100 мл H_2O);

борная кислота (A_{Γ} 61,8; 3,54 г в 343 мл 1 н. NaOH);

довести водой до 900 мл;

довести до желаемого значения pH (от 3 до 12) с помощью 5 н. HCl;

довести водой до 1000 мл.

В некоторых случаях, в частности для проведения лиофилизации, рекомендуют использовать буферы, содержащие летучие компоненты (уксусную кислоту, карбонат и бикарбонат, аммиак и триэтиламин), чтобы избежать высокой концентрации ионов.

Среди других часто используемых растворов можно назвать следующие:

1 М NaOH (M_m 40,0; 4,0 г NaOH в 100 мл H_2O ; хранить в полиэтиленовой посуде)

5 М NaOH (20,0 г NaOH в 100 мл H_2O ; хранить в полиэтиленовой посуде)

1 М HCl (82,8 мл концентрированной (37%) HCl довести водой до 1 л)

5 М HCl (414 мл концентрированной HCl довести водой до 1 л)

0,1 М АДФ (двунариевая соль, M_m 471,2; 471 мг в 10 мл)

0,1 М АТФ (двунариевая соль, тригидрат, M_r 605,2; 605 мг в 10 мл)

0,1 М НАД⁺ (в виде кислоты, M_2 663,4; 663 мг в 10 мл)

0,01 М НАДН (двунариевая соль, M_x 709,4; 71 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6H₂O, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)

3.7.3.4 РАСЧЕТ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

Активность фермента (в МЕ, 1 МЕ ~ 16,67 нкат) при фотометрическом способе детекции можно рассчитать, пользуясь следующими основными уравнениями:

Активность в единице объема (ед./мл):

$$\frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{объем реакционной смеси} \times \text{коэффициент разведения}}{\text{коэффициент поглощения} \times \text{длина оптического пути} \times \text{объем раствора фермента}}$$

Удельная активность (ед./мг):

$$\frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{объем реакционной смеси} \times \text{коэффициент разведения}}{\text{коэффициент поглощения} \times \text{длина оптического пути} \times \text{объем раствора фермента} \times \text{мг белка/мл}}$$

Если применяются другие методы детекции, вместо изменения поглощения $D/4$ и коэффициента поглощения используют другие величины и другие факторы пропорциональности. В большинстве приведенных ниже оптических методов детекции объем реак-

ционной смеси составляет 1 мл, объем фермента — 0,02 мл, а длина оптического пути — 1 см, так что данные уравнения приводятся к следующему виду:

Активность в единице объема (МЕ/мл):

$$\frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{коэффициент разведения}}{\text{коэффициент поглощения} \times 0,02}$$

Удельная активность (МЕ/мг):

$$\frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{коэффициент разведения}}{\text{коэффициент поглощения} \times 0,02 \times \text{мг белка/мл}}$$

В реакциях, идущих с образованием или превращением АД(Ф)Н, коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3$ ммоль/см.

В таком случае:

Активность в единице объема (МЕ/мл):

$$\frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{коэффициент разведения}}{6,3 \times 0,02}$$

Удельная активность (МЕ/мг):

$$\frac{\Delta A/\text{мин} \times \text{коэффициент разведения}}{6,3 \times 0,02 \times \text{мг белка/мл}}$$

В последующих разделах книги подобный расчет для каждого конкретного случая не приводится, а представлены лишь некоторые типичные или, напротив, нестандартные расчеты. В тех случаях, когда не приведено значение коэффициента поглощения или аналогичного параметра, следует использовать стандартную кривую зависимости этого параметра от концентрации субстрата или продукта в соответствующем диапазоне концентраций.

Литература

- Brewer, J.M., Pesce, A.J., Ashworth, R.B. (1974) *Experimental Techniques in Biochemistry*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ
- Cooper, T.C. (1977) *The Tools of Biochemistry*, Wiley, New York
- Deutscher, M.P. (1990) *Meth. Enzymol.* 182
- Ferguson, W.J., Braunschweiger, K.I., Braunschweiger, W.R., Smith, J.R., McCormick, J.J., Wasmann, C.C., Jarvis, N.P., Bell, D.H., Good, N.E. (1980) *Anal. Biochem.* 104, 300-310
- Good, N.E., Izawa, S. (1972) *Meth. Enzymol.* 24B, 53
- Good, N.E., Wingel, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M. (1966) *Biochemistry* 5, 467-477
- Holtzhauser, M. (1997) *Biochemische Arbeitsmethoden*, 3rd edn. Springer, Berlin
- Stoll, V.S., Blanchard, J.S. (1990) *Meth. Enzymol.* 182, 24-38
- Teorell, T., Stenhagen, E. (1939) *Biochem. Z.* 299, 416-419
- Tipton, K.F., Dixon, H.B.F. (1979) *Meth. Enzymol.* 63, 183-234

3.7.4 Определение оксидоредуктаз

3.7.4.1 ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Дегидрогеназы, использующие в качестве косубстратов НАД⁺ или НАДФ⁺, можно легко детектировать с помощью фотометрических методов, наблюдая за появлением максимума поглощения при 340 нм. Более высокий пик поглощения при 260 нм используют редко. При восстановлении косубстрата значение $\epsilon_{260} = 17,4 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹ для НАД⁺ снижается до $14,1 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹ для НАДН, т.е. $\epsilon_{260} = 3,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹. Это значение гораздо ниже аналогичного значения при более высокой длине волны ($\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹). Данный анализ проводят при несколько различающихся длинах волн, поскольку максимум поглощения смещается от 340 нм при 0 °С до 338,5 нм при 38 °С. Можно порекомендовать проводить измерения при 339 нм: поглощение при этом практически такое же, как при 340 нм, но оно менее чувствительно к изменениям температуры. Иногда рекомендуют использовать длины волн 334 и 366 нм, соответствующие линиям поглощения ртутной лампы фильтрового фотометра. Однако для спектрофотометров, действующих во всем диапазоне длин волн, в этом нет никакого преимущества, поскольку длина волны 334 нм близка к длине волны для максимума поглощения с более высоким коэффициентом поглощения ($\epsilon_{334} = 6,18 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹), и напротив, поглощение при 366 нм приблизительно в два раза ниже ($\epsilon_{366} = 3,4 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹). Правда, следует отметить, что полоса Hg при 366 нм более интенсивная, так что фотометрический сигнал является более стабильным. Для спектрофотометров длина волны 340 нм оказывается практически на границе УФ диапазона, так что для проведения анализа можно использовать как УФ лампу, так и лампу видимого света. Поскольку УФ лампы служат не так долго и стоят дороже, следует отдавать предпочтение лампам видимого света. Коэффициент поглощения может выражаться в разных единицах измерения: в данной книге предпочтение отдается значению $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹, однако иногда используют значение $\epsilon_{340} = 6,3$ см² ммоль или $0,63 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-мм⁻¹ в единицах системы СИ.

Реакции, катализируемые дегидрогеназами, обратимы, и обычно их можно изучать как в направлении окисления, так и в направлении восстановления. В зависимости от положения равновесия

такие анализы проводят либо с участием НАД(Ф), либо с участием НАД(Ф)Н. Разница при этом состоит не только в том, что в первом случае поглощение увеличивается, а во втором уменьшается, но и в том, что во втором случае исходное значение поглощения может быть очень высоким. Как уже обсуждалось выше, ферментативные реакции следует анализировать при насыщающей концентрации субстратов, не менее чем в десять раз превышающей значение константы Михаэлиса. Следовательно, в экспериментах с ДЦГ или АДГ концентрация НАДН должна быть не ниже 0,1 мМ, что соответствует исходному значению поглощения 0,63.

Литература

Haid, E., Lehmann, P., Ziegenhom, J. (1975) *Clin. Chem.* 21, 884-887

Ziegenhom, J., Senn, M., Bucher, T. (1976) *Clin. Chem.* 22, 151-160

3.7.4.2 ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

Флуоресцентный анализ отличается высокой специфичностью, так что его можно применять для определения относительно небольшой ферментативной активности. Однако для проведения анализа требуется специальное оборудование (флуориметр), особая аккуратность и реактивы высшей степени очистки. Восстановленная форма НАД(Ф) после возбуждения светом с длиной волны 260 нм испускает свет с длиной волны 470 нм с квантовым выходом 2%. Так что усиление флуоресценции на этой длине волны может служить сигналом протекания ферментативной реакции. Флуоресцентный метод в принципе подходит для анализа всех реакций дегидрогеназы, идущих с образованием или окислением НАД(Ф)Н. Для анализа можно использовать те же растворы в тех же концентрациях, что приведены для соответствующих фотометрических методов. В связи с более высокой чувствительностью метода можно было бы значительно снизить концентрацию НАД(Ф)Н по сравнению с фотометрическими методами, но этого делать не следует, так как необходимая концентрация субстрата определяется его константой Михаэлиса (см. предыдущий раздел). Преимущество метода заключается в возможности детектировать низкие концентрации фермента, особенно в реакциях, идущих в направлении восстановления.

3.7.4.3 АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.1.1.1; алкоголь: НАД оксидоредуктаза.

Алкогольдегидрогеназа (АДГ) содержит в своем составе Zn и существует в различных формах в зависимости от источника выделения. Обычно для анализа применяют фермент из дрожжей или из печени лошади. Они различаются по структуре и по специфичности. АДГ дрожжей наиболее активна в отношении этилового спирта и представляет собой гомотетрамер с молекулярной массой M_x 148 000. Фермент из клеток млекопитающих — это димер с M_x 79 000, предпочитающий в качестве субстратов спирты с более длинной углеродной цепью. В разбавленных растворах фермент нестабилен, так что для его стабилизации следует добавлять БСА.

А. РЕАКЦИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

АДГ катализирует следующую реакцию:



Реакция является обратимой и может быть исследована в обоих направлениях. Константа равновесия реакции составляет $8 \cdot 10^{12}$ М, т.е. равновесие смещено в сторону образования этанола, так что в принципе реакцию проще исследовать именно в этом направлении. Однако серьезным недостатком такого анализа является летучесть и токсичность ацетальдегида.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

0,1 г БСА в 100 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,5 (раствор БСА)

0,01 М НАДН (71 мг в 10 мл H_2O)

0,5 М ацетальдегид (2,2 г (2,82 мл) в 100 мл H_2O)

АДГ разбавляют раствором БСА: фирменные препараты фермента необходимо разбавлять в соответствии с их активностью, например, 0,02 МЕ АДГ конвертирует 0,02 мкмоль НАДН в минуту, что соответствует изменению поглощения на 0,126 единиц — удобное значение для анализа. Если имеется препарат АДГ с активностью 400 МЕ/мг, можно приготовить запасной раствор, содержащий 10 мг/мл (4000 МЕ/мл) фермента в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5. Из этого раствора путем разведения в 4000 раз (2,5 мкл в 10 мл раствора БСА) получают раствор с активностью 1 МЕ/мл. Из этого раствора в реакционную смесь вносят аликвоту 20 мкл.

Реакционная смесь	Концентрация
9,5 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5	95 мМ
0,1 мл 10 мМ НАДН	0,1 мМ
0,2 мл 0,5 М ацетальдегида	2,0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл АДГ (0,02 МЕ)

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Б. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

Поскольку равновесие реакции сдвинуто в сторону образования этанола, обратную реакцию необходимо остановить, используя щелочные значения рН и какой-либо реагент, связывающий ацетальдегид, чтобы вывести его из реакционной среды.

Необходимые растворы

75 мМ глицин/фосфат натрия, рН 9,0 (10 г $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ + 0,5 г глицина в 300 мл H_2O , доводят до рН 9,0 раствором 1 М HCl)

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

Этиловый спирт (M_r 46,1, плотность 0,81 г/мл)

0,1 М НАД (0,663 г в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5)

0,1 М 1,4-дителиозитрит (ДТЭ, M_m 154,3; 154 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5)

0,1 г БСА в 100 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5 (раствор БСА)

2,2 М семикарбазид (M_m 111,5; 2,5 г семикарбазида- HCl в 10 мл 2 н. NaOH , доводят до рН 6,3-6,5 раствором 5 н. NaOH)

Раствор АДГ — способ разведения см. выше.

Реакционная смесь	Концентрация
8,8 мл 75 мМ глицина/фосфата натрия, рН 9,0	66 мМ
0,3 мл этанола	0,53 М
0,2 мл 0,1 М НАД	2,0 мМ
0,2 мл 0,1 М ДТЭ	2,0 мМ
0,3 мл 2,2 М семикарбазида	66 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл разбавленного раствора АДГ

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С).

Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН
 $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Литература

Andersson, L., Mosbach, K. (1982) *Meth. Enzymol.* 89, 435-445

Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 139-141.
 Verlag Chemie, Weinheim

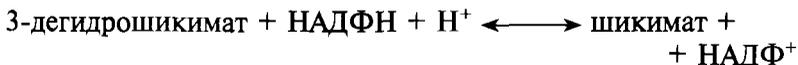
Dafeldecker, W.P., Meadow, P.E., Pares, X., Vallee, B.L. (1981) *Biochemistry* 20,
 6729-6734

Pietruszko, R. (1982) *Meth. Enzymol.* 89, 429-435

3.7.4.4 ШИКИМАТДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.1.1.25; шикимат:НАДФ⁺ 3-оксидоредуктаза

Фермент участвует в биосинтезе ароматических аминокислот
 и осуществляет следующую реакцию:



Анализируют обратную реакцию.

Необходимые растворы

0Д М карбонат натрия, рН 10,6 (Na_2CO_3 , M_T 106; 10,6 г/л до-
 водят до рН 10,6 раствором 0,1 М NaHCO_3 (8,4 г/л))

0,1 М шикимовая кислота (M_T 174,2; 174 мг в 10 мл)

0,1 М НАДФ (M_m 787,4 двунариевая соль; 787 мг в 10 мл)

Реакционная смесь

9,2 мл 0,1 М карбоната натрия, рН 10,6

0,4 мл 0,1 М шикимовой кислоты

0,2 мл 0,1 М НАДФ

Концентрация

92 мМ

4 мМ

2 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл разбавленного раствора фермента

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С). Для
 расчетов используют коэффициент поглощения НАДФН

$\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Литература

- Chaudhuri, S., Coggins, J.R. (1985) *Biochem. J.* 226, 217-223
 Coggins, J.R., Bookcock, M.R., Chaudhuri, S., Lambert, J.M., Lumsden, J., Nimmo, G.A., Smith, D.D.S. (1987) *Meth. Enzymol.* 143, 325-341
 Lumsden, J., Coggins, J.R. (1977) *Biochem. J.* 599-607

3.7.4.5 L-ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.1.1.27; Ь-лактат:НАД⁺ оксидоредуктаза; L-лактатдегидрогеназа (ЛДГ)



Как и в случае АДГ, можно следить за ходом реакции в обоих направлениях, но в связи с положением равновесия реакции легче следить за восстановлением пирувата. Следует, однако, учитывать высокое исходное значение поглощения НАДН.

А. Реакция восстановления
 (спектрофотометрический анализ)



Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,0

0,01 М НАДН (71 мг в 10 мл Н₂О)

0,1 М пируват (пируват натрия, *M_r* 110; 110 мг в 10 мл Н₂О)

Запасной раствор ЛДГ (из сердца свиньи, например, 10 мг/мл, разбавляют до активности 1 МЕ/мл 0,1 М раствором фосфата калия, рН 7,0)

Реакционная смесь

9,4 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0

0,2 мл 0,01 М НАДН

0,2 мл 0,1 М пирувата

Концентрация

94 мМ

0,2 мМ

2,0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл разбавленного раствора ДДГ

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹.

Б. РЕАКЦИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ (ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ)

Флуоресцентный метод определения ЛДГ применяется для анализа всех реакций, идущих с образованием или превращением НАД(Ф)Н. Этот метод чувствительнее спектрофотометрического анализа примерно в 100 раз, но чувствительность зависит в том числе и от качества используемого прибора.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,0

0,01 М НАДН (71 мг в 10 мл H₂O)0,1 М пируват (пируват натрия, M_x 110; ПО мг в 10 мл H₂O)

Запасной раствор ЛДГ (из сердца свиньи, например, 10 мг/мл, разбавляют до активности 1 МЕ/мл 0,1 М раствором фосфата калия, рН 7,0)

Реакционная смесь

19,35 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0

0,05 мл 0,01 М НАДН

0,4 мл 0,1 М пирувата

Концентрация

97 мМ

0,025 мМ

2,0 мМ

Ход определения

1,98 мл реакционной смеси

0,02 мл разбавленного раствора ЛДГ

Следят за изменением интенсивности флуоресценции (Д/мин) на длине волны 470 нм (25 °С) при возбуждении на длине волны 260 нм. Для определения коэффициента пропорциональности строят стандартную кривую для НАДН в необходимом диапазоне концентраций.

Расчеты

Активность в единице объема (МЕ/мл):

$$\frac{\Delta I_{\text{фл}}/\text{мин} \times \text{коэффициент пропорциональности} \times 2 \times \text{коэффициент разведения}}{0,02}$$

Удельная активность (МЕ/мг):

$$\frac{\Delta I_{\text{фл}}/\text{мин} \times \text{коэффициент пропорциональности} \times 2 \times \text{коэффициент разведения}}{0,02 \times \text{мг белка/мл}}$$

В. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ**Необходимые растворы**

0,1 М фосфат калия, рН 7,6

0,1 М НАД (0,663 г в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6)

0,5 М лактат (лактат натрия, M_m 112; 560 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6)

Запасной раствор ЛДГ (из сердца свиньи, например, с активностью 550 МЕ/мл и концентрацией 10 мг/мл, разбавляют до активности 1 МЕ/мл 0,1 М раствором фосфата калия, рН 7,6)

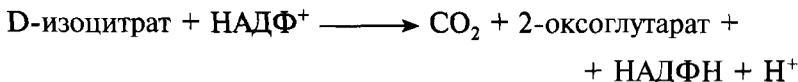
Реакционная смесь	Концентрация
8,2 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6	82 мМ
0,2 мл 0,1 М НАД	2 мМ
1,4 мл 0,5 М лактата натрия	70 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл разбавленного раствора ЛДГ

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С).

Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.**Литература**Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 232-233, Verlag Chemie, WeinheimGravie, E.I. (1980) *Microbiol. Rev.* 44, 106-139Lee, C.Y., Yuan, J.H., Goldberg, E. (1982) *Meth. Enzymol.* 89, 351-358**3.7.4.6 ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА**КФ 1.1.1.42; изоцитратдегидрогеназа (НАДФ⁺), изоцитрат: НАДФ⁺ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)

Описанная ниже процедура определения с НАДФ подходит также для НАД и фермента изоцитратдегидрогеназа (НАД⁺), КФ 1.1.1.41, изоцитрат:НАД⁺ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая).

Необходимые растворы

0,1 М имидазол-НС1, рН 8,0

0,01 М НАДФ (M_m 787,4; 79 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)
 0,025 М изоцитрат (тринатриевая соль изолимонной кислоты,
 M_r 258,1; 65 мг в 10 мл)
 Запасной раствор фермента (10 мг/мл, перед использованием
 разводят в 100 раз)

Реакционная смесь	Концентрация
8,8 мл 0,1 М имидазол-НСl, рН 8,0	82 мМ
0,4 мл 0,01 М НАДФ ⁺	0,4 мМ
0,4 мл 0,1 М MgCl_2	4,0 мМ
0,2 мл 0,025 М изоцитрата	0,5 мМ

Ход определения

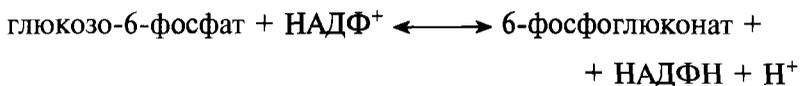
0,98 мл реакционной смеси
 0,02 мл фермента
 Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С).
 Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН
 $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Литература

Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 230-231, Verlag Chemie, Weinheim
 Plaut, G.E.W. (1963) *The Enzymes*, 2nd edn. Vol. 7, 105-126; Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K. eds.

3.7.4.7 ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.1.1.49; В-глюкозо-6-фосфат:НАДФ⁺ оксидоредуктаза;
 Г6ФДГ



Необходимые растворы

0,1 М триэтанолламин-NaOH, рН 7,6 (триэтанолламин • HCl,
 M_m 185,7; 18,6 г растворяют в 800 мл воды, доводят рН с
 помощью 1 М NaOH, доводят объем до 1 л)
 0,1 М D-глюкозо-6-фосфат (натриевая соль, M_m 282,1; 282 мг
 в 10 мл)
 0,1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)
 0,04 М НАДФ (M_r 787,4; 315 мг в 10 мл)

Реакционная смесь	Концентрация
9,1 мл 0,1 М триэаноламина-NaOH, pH 7,6	91 мМ
0,5 мл 0,1 М MgCl ₂	5,0 мМ
0,1 мл 0,1 М D-глюкозо-б-фосфата	1,0 мМ
0,1 мл 40 мМ НАДФ	0,4 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Литература

Beigmeier, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 204-205, Verlag Chemie, Weinheim

3.7.4.8 МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.1.1.37; б-малат:НАД⁺ оксидоредуктаза; МДГ



Для анализа обычно используют обратную реакцию.

Необходимые растворы

0Д М фосфат калия, pH 7,5

0,01 М НДДН (71 мг в 10 мл Н₂О)

0,1 М щавелевоуксусная кислота (Л/г 132,1; 132 мг в 10 мл

0,1 М калийфосфатного буфера, pH 7,5)

Запасной раствор МДГ (например, 10 мг/мл, разводят до активности 1 МЕ/мл 0,1 М раствором фосфата калия, pH 7,5)

Реакционная смесь	Концентрация
9,1 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,5	91 мМ
0,2 мл 0,01 М НДДН	0,2 мМ
0,5 мл 0,1 М щавелевоуксусной кислоты	5,0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл разбавленного раствора МДГ

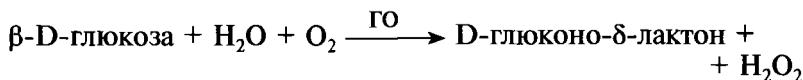
Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

ЛитератураOchoa, S. (1955) *Meth. Enzymol.* 1, 735-739Raval, D.N., Wolfe, R.G. (1962) *Biochemistry I*, 1118-1123

3.7.4.9 ГЛЮКОЗООКСИДАЗА

КФ 1.1.3.4; ГО, р-β-глюкозагкислород 1-оксидоредуктаза

Фермент используют для анализа в сопряженной реакции с пероксидазой (ПО); донором водорода может выступать, например, о-дианизидин:

**Необходимые растворы**

0,1 М фосфат калия, рН 7,0

Раствор о-дианизидина (о-дианизидина дигидрохлорид, M_r 317,2; *твердое вещество может оказывать канцерогенное действие!* Готовят 1 мл 25 мМ раствора в воде (7,9 мг/мл) и растворяют в 100 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0; насыщают кислородом в течение 10 мин)

0,5 М глюкоза (M_r 180,2, 90 мг/мл)

Раствор пероксидазы (ПО из корня хрена, разводят до активности 120 МЕ/мл 0,1 М раствором фосфата калия, рН 7,0)

Реакционная смесь

7,7 мл раствора дианизидина в 0,1 М 0,2 мМ

растворе фосфата калия, рН 7,0

2 мл 0,5 М глюкозы

0,1 мл ПО

Концентрация

77 мМ

100 мМ

1,2 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Следят за изменением поглощения при 436 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения $\epsilon_{436} = 8300 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Расчет

Активность в единице объема (МЕ/мл):

$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{коэффициент разведения}}{8,3 \times 0,02}$$

Удельная активность (МЕ/мг):

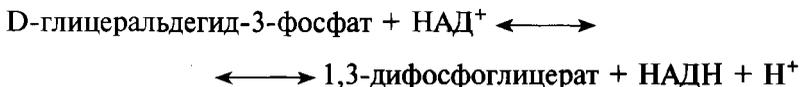
$$\frac{\Delta A / \text{мин} \times \text{коэффициент разведения}}{8,3 \times 0,02 \times \text{мг белка/мл}}$$

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 201-202, Verlag Chemie, Weinheim
- Bright, H.B., Porter, D.J.T. (1975) *The Enzymes*, 3rd edn., Boyer, P. D. (ed.) Vol. 12B, pp. 421-505, Academic Press, New York
- Keilin, D., Hartree, E.F. (1952) *Biochem. J.* 50, 331-341
- Pazur, J.H. (1966) *Meth. Enzymol.* 9, 82-87

3.7.4.10 ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.2.1.12; ГАФД, В-глицеральдегид-3-фосфат:НАД⁺оксидоредуктаза (фосфорилирующая)



Для анализа можно использовать либо прямую реакцию, либо обратную реакцию в сопряженной системе. Для проведения прямой реакции нужен нестабильный и дорогостоящий DL-глицеральдегид-3-фосфат.

А. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

Необходимые растворы

- 0,1 М триэтаноламин • HCl/NaOH, pH 7,6 (триэтаноламин • HCl, M_T 185,7; 18,6 г разводят в 800 мл воды, доводят pH с помощью 1 М NaOH, доводят объем до 1 л)
- 0,3 М DL-глицеральдегид-3-фосфат (M_T 170,1; готовят водный раствор 50 мг/мл, *нестабилен!*)
- 0,1 М НАД⁺ (в форме кислоты, M_T 663,4; 663 мг в 10 мл)
- 0,1 М дигидроарсенат калия (M_T 180,0; 180 мг в 10 мл)

Реакционная смесь

9,3 мл 0,1 М триэтанолamina • HCl/NaOH, pH 7,6

0,03 мл 0,3 М глицеральдегид-3-фосфата

0,3 мл 0,1 М дигидроарсената калия

0,2 мл 0,1 М НАД⁺

Концентрация

93 мМ

0,9 мМ

3,0 мМ

2,0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Следят за увеличением поглощения при 340 нм (25 °С).

Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН

 $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.**Б. РЕАКЦИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ, СОПРЯЖЕННАЯ С РЕАКЦИЕЙ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ 3-ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗОЙ (ФГК; КФ 2.7.2.3)****Необходимые растворы**0,1 М триэтанолламин- NaOH , pH 7,6 (триэтанолламин • HCl , M_z 185,7; 18,6 г разводят в 800 мл воды, доводят pH с помощью 1 М NaOH , доводят объем до 1 л)0,1 М 3-фосфоглицерат (двунариевая соль, M_z 230,0; 230 мг в 10 мл)0,1 М АТФ (двунариевая соль, тригидрат, M_z 605,2; 605 мг в 10 мл)0,01 М НАДН (двунариевая соль, M_T 709,4; 71 мг в 10 мл)0,1 М ЭДТА (M_z 292,2; 292 мг в 10 мл)0,1 М сульфат магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, M_z 246,5; 247 мг в 10 мл)

3-фосфоглицераткиназа из дрожжей (-2000 МЕ/мг)

Реакционная смесь	Концентрация
8,6 мл 0,1 М триэтанолламина- NaOH , pH 7,6	86 мМ
0,5 мл 0,1 М 3-фосфоглицерата	5,0 мМ
0,1 мл 0,1 М АТФ	1,0 мМ
0,2 мл 0,01 М НАДН	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М ЭДТА	1,0 мМ
0,2 мл 0,1 М сульфата магния	2,0 мМ
0,1 мл 3-фосфоглицераткиназы	10 МЕ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН

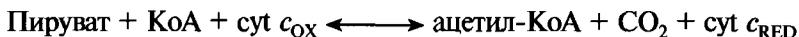
 $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Литература

- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bucher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G. (1953) *Zeitschrift für Naturforschung* 8b, 555-577
 Heinz, F., Freimuller, B. (1982) *Meth. Enzymol.* 89, 301-305
 Krebs, H. (1955) *Meth. Enzymol.* 1, 407-411
 Scheek, R.M., Slater, E.C. (1982) *Meth. Enzymol* 89, 305-309

3.7.4.11 ПИРУВАТ:ФЕРРЕДОКСИН ОКСИДОРЕДУКТАЗА

КФ 1.2.7.1 пируватсинтаза, пируват:ферредоксин 2-оксидоредуктаза (КоА-ацетилирующая)

**Необходимые растворы**

- 0,05 М Трис-НС1, рН 7,3
 0,01 М цитохром *c* (M_x 12 380; 620 мг в 5 мл)
 0,1 М пируват натрия (M_r 110,0; 110 мг в 10 мл)
 0,01 М КоА (в форме кислоты M_m 767,5; в форме КоА • Li₃ 785,4; 23 мг в 3 мл)

Реакционная смесь	рН	Концентрация
9,1 мл 0,05 М Трис-НС1,	7,3	91 мМ
0,1 мл 0,01 М цитохрома <i>c</i>		0,1 мМ
0,5 мл 0,1 М пирувата		5,0 мМ
0,1 мл 0,01 М КоА		0,1 мМ

Ход определения

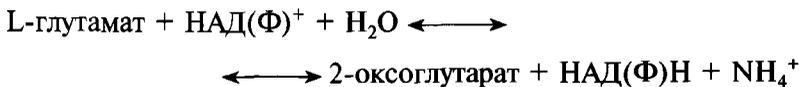
0,98 мл реакционной смеси
 0,02 мл раствора фермента
 Следят за повышением поглощения при 550 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения цитохрома *c* $\epsilon_{550} = 21 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

Литература

- Kerscher, L., Oesterheld, D. (1977) *FEBS Lett.* 83, 197-201
 Rabinowitz, J.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1361-1365

3.7.4.12 ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.4.1.3; γ -глутамат:НАД(Ф)-оксидоредуктаза (дезаминирующая)



Анализ основан на обратной реакции; для ее стимуляции используют АДФ.

Необходимые растворы

0,1 М имидазольный буфер, рН 7,9 (имидазол, M_m 68,1; 0,68 г растворяют в 80 мл воды, доводят рН с помощью 1 М HCl, доводят объем до 100 мл)

0,2 М оксоглутарат (натриевая соль 2-оксоглутаровой кислоты, L_r 168,1; 336 мг в 10 мл)

10 М ацетат аммония (M , 77,1; 7,7 г в 10 мл)

0,01 М НАДН (двунариевая соль, M_m 709,4; 71 мг в 10 мл)

0,1 М ЭДТА (M_r 292,2; 292 мг в 10 мл)

0,1 М АДФ (двунариевая соль, M_m 471,2; 471 мг в 10 мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,4 мл 0,1 М имидазольного буфера, рН 7,9	84 мМ
0,7 мл 0,2 М оксоглутарата	14 мМ
0,2 мл ЮМ ацетата аммония	0,2 М
0,2 мл 0,01 М НАДН	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М ЭДТА	1,0 мМ
0,2 мл 0,1 М АДФ	2,0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С). Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

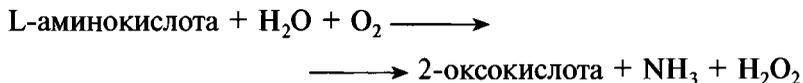
Литература

- Goldin, B.R., Frieden, C. (1971) *Current Topics in Cellular Regulation*, Horecker, B. L., Stadtman, E.R. (eds.) pp. 4-77, Academic Press, New York
- Schmidt, E., Schmidt, F.W. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.), Vol. 3, 3rd edn. pp. 216-227, VCH, Weinheim

3.7.4.13 ОКСИДАЗА L-АМИНОКИСЛОТ

КФ 1.4.3.2, L-аминокислота:кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая)

В анализе используют сопряженную реакцию с пероксидазой (ПО):



**Необходимые растворы**

0,2 М триэтаноламин (триэтаноламин • HCl, M_m 185,7; доводят до pH 7,6 и добавляют 0,1% L-лейцин и 0,0065% о-дианизидин)

Пероксидаза (ПО, из корней хрена, разводят до активности 120 МЕ/мл 0,1 М фосфатом калия, pH 7,0)

Ход определения

0,97 мл раствора триэтаноламина

0,01 мл раствора пероксидазы

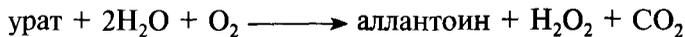
Реакцию начинают добавлением 0,02 мл раствора фермента (или воды в растворе сравнения) и следят за снижением поглощения при 436 нм (25 °С) около 5 мин. Для расчетов используют коэффициент поглощения $\epsilon_{436} = 8300 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (см. разд. 3.7.4.9).

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 149-151, Verlag Chemie, Weinheim
- Bright, H.B., Porter, D.J.T. (1975) *The Enzymes*, 3rd edn., Boyer, P.D. (ed.) Vol. 12B, pp. 421-505, Academic Press, New York
- Meister, A., Wellner, D. (1963) *The Enzymes*, 2nd edn., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 7, pp. 609-648

3.7.4.14 УРИКАЗА

КФ 1.7.3.3, урат:кислород оксидоредуктаза, уратоксидаза, «медный фермент»

**Необходимые растворы**

0,1 М борат натрия, pH 8,5 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, M_z 381,4; 3,8 г растворяют в 100 мл воды, доводят pH с помощью 0,1 М борной кислоты, перед использованием насыщают кислородом 15 мин)

1,0 мМ мочева кислота (M_m 168,1; растворяют 17 мг в 100 мл боратного буфера, pH 8,5, при необходимости нагревают до ~ 50 °С)

Реакционная смесь	Концентрация
9,4 мл 0,1 М бората натрия, рН 8,5	94 мМ
0,4 мл 1,0 мМ мочево́й кислоты	0,04 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Следят за изменением поглощения при 295 нм (25 °С);

 $\epsilon_{295} = 12,6 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.**Литература**

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, 322-323, Verlag Chemie, Weinheim
- Leone, E. (1955) *Meth. Enzymol.* 2, 485-489
- Mahler, H.R. (1963) *The Enzymes*, 2nd edn. Boyer, P. D., Lardy, H. A., Myrback, K. (eds.), Vol. 8, pp. 285-296. Academic Press, New York

3.7.4.15 КАТАЛАЗА**КФ 1.11.1.6, H₂O₂:H₂O₂ оксидоредуктаза**

Этот «зеленый белок» состоит из четырех идентичных субъединиц (M_r 60 000), каждая из которых содержит протогематин IX в высокоспиновом состоянии с ионом железа(III) в центре. Четырнадцать координационными связями железо связано с порфириновым кольцом, пятая связь направлена на остаток гистидина в белке, а шестое положение остается свободным и может быть занято такими анионами, как цианид или фторид, которые блокируют активность фермента. При связывании цианида железо смещается в плоскость порфиринового кольца и система переходит из высокоспинового в низкоспиновое состояние, что сопровождается значительным изменением спектральной картины (см. обзор Nicholls & Schonbaum, 1963). Каталаза была одним из первых ферментов, который удалось кристаллизовать (Sumner & Dounce, 1937), и поскольку фермент имеет сильную тенденцию кристаллизоваться, лучше всего его хранить именно в виде кристаллической суспензии. Субстрат каталазы — пероксид водорода — повреждает фермент, особенно в высоких концентрациях. В связи с этим нельзя проводить анализ при насыщающей концентрации субстрата, так что определить значение константы Михаэлиса путем прямого кинетического анализа невозможно. Фермент имеет ко-

эффицент поглощения $38 \cdot 10^3$ л-ммоль⁻¹-мм¹ ($9,5$ л-ммоль⁻¹-мм¹ в расчете на одну гемовую группу) при 405 нм.

Необходимые растворы

$0,05$ М фосфат калия, рН $7,0$

Раствор пероксида водорода (около 10 мМ): $0,06$ мл 30% H_2O_2 разводят в 50 мл $0,05$ М фосфата калия, рН $7,0$; величина поглощения относительно буфера должна быть $0,50 \pm 0,01$ при 240 нм. Если это не так, доводят поглощение до этой величины с помощью буфера или H_2O_2 .

Ход определения

$0,98$ мл раствора H_2O_2

$0,02$ мл раствора фермента (концентрированный запасной раствор разбавляют примерно в 2000 раз $0,05$ М раствором фосфата калия, рН $7,0$)

Следят за снижением поглощения при 240 нм (25 °С) в кварцевой кювете; $\epsilon_{240} = 4,0 \cdot 10^3$ л-ммоль⁻¹-мм¹. Изменение поглощения на $0,04$ /мин соответствует разложению 1 мкмоль H_2O_2 в минуту, ~ 1 МЕ, $\sim 16,67$ нкат.

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1955) *Biochem. Z.* 327, 255-258
 Chance, B., Maehly, A.C. (1955) *Meth. Enzymol.* 2, 764-775
 Nicholls, P., Schonbaum, G.R. (1963) *The Enzymes*, Boyer, P.D., Lardy, H.A., Myrback, K. (eds.), Vol. 8, pp. 147-225. Academic Press, New York
 Sumner, J.B., Dounce, A.L. (1937) *J. Biol. Chem.* 121, 417-424

3.7.4.16 ПЕРОКСИДАЗА

КФ 1.11.1.7; донор: H_2O_2 оксидоредуктаза

донор + $H_2O_2 \longrightarrow$ окисленный донор + $2 H_2O$

Фермент (чаще всего из корней хрена) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 44 ООО. Он, как и каталаза, содержит в качестве простетической группы протогематин IX. Фермент специфичен по отношению к субстрату-акцептору (H_2O_2), но реагирует со многими субстратами-донорами, так что все они могут использоваться в ферментативном анализе. К субстратам пероксидазы относятся: 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион (люминол), 3-амино-9-этилкарбазол, 5-аминосолициловая кислота (5АСК), АБТС, 4-хлор-1-нафтол, 3,3'-диаминобензидин (ДАБ), о-дианизидин, гваякол, о-фенилендиамин, аскорбиновая

кислота, резорцин, пирогаллол, гидрохинон, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Пероксидаза широко используется в конъюгатах, например, с антителами для Вестерн-блота и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или с коллоидным золотом в клеточной биологии (Basbaum, 1989).

А. МЕТОД С АБТС

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 6,0

0,02 М 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) (АБТС, диаммонийная соль, M_T 548,7; 1,1 г в 0,1 М фосфате калия, рН 6,0)

Раствор H_2O_2 (около 10 мМ): 0,06 мл 30%-ного H_2O_2 разводят в 50 мл 0,1 М фосфата калия, рН 6,0; величина поглощения относительно буфера должна быть около 0,50 при 240 нм.

Реакционная смесь и ход определения

0,78 мл 0,1 М фосфата калия, рН 6,0

0,1 мл 0,02 М АБТС

0,4 мл раствора H_2O_2

0,02 мл раствора фермента

Концентрация

98 мМ

2,0 мМ

1,0 мМ

Следят за изменением поглощения при 414 нм (25 °С);

$\epsilon_{414} = 24,6 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹. Следует учесть, что из 1 моля H_2O_2 образуется 2 моля окисленного АБТС (Szutowicz et al., 1984).

Б. МЕТОД С ГВЯКОЛОМ

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,0

0,02 М гваякол (2-метоксифенол, M_x 124,1; 24,8 мг растворяют в 10 мл)

Раствор H_2O_2 (около 10 мМ): 0,06 мл 30%-ного H_2O_2 разводят в 50 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0; величина поглощения относительно буфера должна быть около 0,50 при 240 нм.

Реакционная смесь

9,55 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0

0,15 мл 0,02 М гваякола

Концентрация

98 мМ

0,3 мМ

Ход определения

0,97 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента (концентрированный запасной раствор разводят примерно в 2000 раз 0,1 М фосфатом калия, рН 7,0)

Реакцию начинают добавлением Концентрация

0,01 мл раствора H_2O_2 0,1 мМ

Следят за изменением поглощения при 436 нм (25 °С);
 $\epsilon_{436} = 25,5 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹ (Makinen and Tenovon, 1982).

В. МЕТОД С ДИАНИЗИДИНОМ

Внимание: о-дианизидин оказывает канцерогенное действие!

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 6,0

0,03 М дигидрохлорид о-дианизидина (3,3'-диметоксибензи-
 дина дигидрохлориц, M_x 317,2; 95 мг растворяют в 10 мл
 метанола)

Раствор H_2O_2 (около 10 мМ): 0,06 мл 30%-ного H_2O_2 разводят
 в 50 мл 0,1 М фосфата калия, рН 6,0; величина поглощения
 относительно буфера должна быть около 0,50 при 240 нм.

Реакционная смесь

9,6 мл 0,1 М фосфата калия, рН 6,0

0,1 мл 0,03 М о-дианизидина

Концентрация

98 мМ

0,3 мМ

Ход определения

0,97 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Реакцию начинают добавлением

0,01 мл H_2O_2

0,1 мМ

Следят за изменением поглощения при 436 нм (25 °С);
 $\epsilon_{436} = 8,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹ см⁻¹.

Литература

- Basbaum, A.I. (1989) *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1811
 Chance, B., Maehly, A.C. (1955) *Meth. Enzymol.* 2, 764-775
 Childs, R.E., Bardsley, W.G. (1975) *Biochem. J.* 145, 93-103
 Engvall, E. (1980) *Meth. Enzymol.* 70, 419-439
 Makinen, K.K., Tenovuo, J. (1982) *Anal. Biochem.* 126, 100-108
 Plitter, J., Becker, R. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.),
 Vol. 3, pp. 286-293, Verlag Chemie, Weinheim
 Szutowicz, A., Kobes, R.D., Orsulak, P.J. (1984) *Anal. Biochem.* 138, 86-94

3.7.4.17 ЛЮЦИФЕРАЗА

КФ 1.13.12.7, люциферин 4-монооксигеназа (АТФ-гидролизующая) из светляков *Photinus pyralis*.



Интенсивность излучаемого света / связана с константой Михаэлиса следующим уравнением:

$$I = \frac{d(h\nu)}{dt} = \frac{V_{\max}[\text{АТФ}]}{K_M + [\text{АТФ}]}$$

где h — постоянная Планка, ν — частота излучаемого света. При очень низкой концентрации АТФ ($[\text{АТФ}] \ll K_M$) уравнение Михаэлиса-Ментен приводится к виду

$$I = \text{const} \times [\text{АТФ}]$$

где $\text{const} = V_{\max}/K_M$. Таким образом, интенсивность излучаемого света пропорциональна концентрации АТФ.

Необходимые растворы

0,1 М Трис-ацетат, рН 7,75

10 мкМ АТФ (двунариевая соль, тригцрат, M_r 605,2; готовят 10 мМ раствор, растворяя 60,5 мг в 10 мл, и разводят 10 мкл в 10 мл)

0,1 М MgSO_4 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, M_r 246,5; 246 мг в 10 мл)

1 мМ D-люциферин (4,5-дигидро-(6-гидрокси-2-бензотиазол-4-тиазолкарбоновая кислота, M_x 280,3; натриевая соль M_x 302,3; 3 мг в 10 мл 0,1 М Трис-ацетата, рН 7,75, хранить при -20°C)

Люцифераза светляков (1 мкг/мл в 0,1 М Трис-ацетатном буфере, рН 7,75)

Реакционная смесь	Концентрация
0,34 мл Трис-ацетатного буфера, рН 7,75	68 мМ
0,05 мл 0,1 М MgSO_4	10 мМ
0,05 мл 1 мМ D-люциферина	0,1 мМ
0,05 мл люциферазы	50 нг

Ход определения

Реакцию начинают добавлением

0,01 мл АТФ 0,2 мкМ

Измеряют интенсивность свечения (максимум при 562 нм) через 10 с после начала реакции (25 °С). Строят калибровочную кривую для АТФ в концентрации от 0,05 до 0,5 мкМ.

Одна единица ферментативной активности определяется как выход света в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 5 пмоль АТФ и 7,5 нмоль люциферина в буфере Трис-глицин, рН 7,6, при 25 °С. Одна световая единица создает пик, высота которого эквивалентна пику 0,02 мкКи ^{14}C в сцинтилляционном коктейле РРО/РОРО¹ (до 1991 г. одна единица активности определялась как количество люциферазы, продуцирующей 1 нмоль пирофосфата в минуту (рН 7,6, 25 °С) в присутствии 0,6 мМ АТФ и 0,1 мМ D-люциферина).

Литература

DeLuka, M., McElroy, W.D. (1978) *Meth. Enzymol.* 57, 3-15

Wulff, K. (1982) *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.), 3rd edn. Vol. 1, pp. 340-368, Verlag Chemie, Weinheim

3.7.5 Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГК)

Этот большой комплекс ферментов с общей молекулярной массой около $5 \cdot 10^6$ (из бактериального источника) состоит из трех различных ферментов, катализирующих последовательные реакции: пируватдегидрогеназы (E1p, КФ 1.2.4.1), дигидролипоамид-ацетилтрансферазы (E2p, КФ 2.3.1.12) и дигидролипоамид-дегидрогеназы (E3p, КФ 1.8.1.4). Пируватдегидрогеназный комплекс из высших организмов содержит, кроме того, еще два регуляторных фермента: киназу пируватдегидрогеназы, которая инактивирует комплекс, фосфорилируя остаток серина в компоненте E1, и фосфатазу пируватдегидрогеназы, которая реактивирует фермент путем отмены фосфорилирования.

Активность ферментного комплекса можно анализировать как в целом, так и следя за реакциями его компонентов. Как при анализе процесса в целом, так и при анализе реакции компонента E1 следят за образованием CO_2 манометрическим методом, с помощью специфического электрода или путем определения $^{14}\text{CO}_2$ с использованием радиоактивного ^{14}C -пирувата. Кроме того, существуют и более удобные оптические методы анализа, в частности метод, позволяющий следить за образованием НАДН в процессе в целом. Однако следует помнить, что если, например, в грубом экстракте присутствует ЛДГ, она захватывает НАДН и с

¹ РРО — 2,5-дифениллоксазол, РОРО — 1,4-бис(5-фениллоксазоллил-2)бензол.

его помощью превращает пируват в лактат, т. е. противодействует пируватдегидрогеназной реакции. Эту проблему можно решить, используя более трудоемкий и менее чувствительный метод определения активности ПДГК с регенерацией НАД⁺.

Общую реакцию, осуществляемую пируватдегидрогеназным комплексом, можно записать следующим образом:



Здесь ТДФ — тиаминдифосфат — кофактор компонента Е1, а ФАД_{ОХ} и ФАД_{КШ} — окисленная и восстановленная форма кофактора компонента Е3 — флавинадениндинуклеотида.

3.7.5.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПДГК ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ НАД*

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,6

0,1 М НАД⁺ (свободная кислота, M_2 663,4; 663 мг в 10 мл)

0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, или кокарбоксилаза, M_x 460,8; 46,1 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6H₂O, M_m 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,1 М пируват (пируват натрия, M_x 110,0; ПО мг в 10 мл)

0,1 М дитиоэритрит (ДТЭ, M_m 154,2) или дитиотрейтол (ДТТ, M_x 154,2; 154 мг в 10 мл)

0,01 М кофермент А (свободная кислота, M_x 767,5; Ко А - Li₃, M_m 785,4; 23 мг в 3 мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,8 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6	88 мМ
0,25 мл 0,1 М НАД ⁺	2.5 мМ
0,20 мл 0,01 М ТДФ	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М MgCl ₂	1.0 мМ
0,25 мл 0,1 М пирувата	2.5 мМ
0,1 мл 0,1 М ДГЭ	1.0 мМ
0,1 мл 0,01 М кофермента А	0,1 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

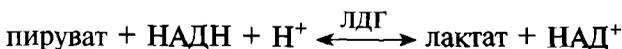
0,02 мл фермента

Следят за изменением поглощения при 340 нм (37 °С).

Для расчетов используют коэффициент поглощения НАДН

 $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1}\text{см}^{-1}$.**Литература**Schwartz, E.R., Old, L.O., Reed, L.J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Communt.* 31, 495-500**3.7.5.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПДГК
С РЕГЕНЕРАЦИЕЙ НАД***

Для регенерации НАД в данном методе используют лактат-дегидрогеназу (ЛДГ). Ацетилфосфат образуется из ацетил-КоА под действием фосфотрансацетилазы (ФТА) и превращается в соответствующую гидроксамовую кислоту, которая образует окрашенный комплекс с ионами Fe³⁺ (Korkes et al., 1951, Reed & Willms, 1966). В данном методе требуется определение лишь конечной точки реакции.

**Необходимые растворы**

0,1 М фосфат калия, рН 7,6

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ · 6H₂O, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)

- 0,1 М пируват (пируват натрия, M_f 110,0; 110 мг в 10 мл)
 0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, или кокарбоксилаза, M_T 460,8; 46,1 мг в 10 мл)
 0,1 М дитиозэритрит (ДТЭ, M_m 154,2) или дитиотрейтол (ДТТ, M_m 154,2; 154 мг в 10 мл)
 0,01 М кофермент А (свободная кислота, M_z 767,5; КоА • Li₃, M_m 785,4; 23 мг в 3 мл)
 0,1 М НАД⁺ (свободная кислота, M_f 663,4; 663 мг в 10 мл)
 Фосфотрансацетилаза (4000 МЕ/мл)
 Лактатдегидрогеназа (10 000 МЕ/мл)
 2 М гидроксилламин (смешивают равные объемы 4 М гидроксиламина гидрохлорида, M_z 69,49, и 4 М КОН, M_m 56,11)
Реагент FeCl₃:
 100 мл 5% FeCl₃ (8,33 г FeCl₃ • 6H₂O, A_f 270,3, доводят до 100 мл раствором 0,1 М HCl)
 100 мл 12% ТХУ (трихлоруксусная кислота, M_T 163,4)
 100 мл 3 М HCl (смешивают одну часть концентрированной кислоты с тремя частями воды)
 Смешивают вместе три раствора.

Реакционная смесь	Концентрация
4,0 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6	80 мМ
0,05 мл 0,1 М MgCl ₂	1,0 мМ
0,23 мл 0,1 М пирувата	4,6 мМ
0,1 мл 0,01 М ТДФ	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М ДТЭ	2,0 мМ
0,05 мл 0,01 М кофермента А	0,1 мМ
0,05 мл 0,1 М НАД ⁺	1,0 мМ
0,01 мл фосфотрансацетилазы	4 МЕ/мл
0,01 мл ЛДГ	10 МЕ/мл

Реакционную смесь хранить на льду и использовать в течение дня.

Ход определения

- 0,48 мл реакционной смеси
 0,02 мл фермента

Смесь инкубируют 15 мин при 30 °С, затем помещают образец на лед и добавляют 0,2 мл 2 М гидроксилламина. После 10 мин инкубации при комнатной температуре добавляют 0,6 мл реагента FeCl₃. Центрифугируют 5 мин и определяют поглощение при 546 нм против раствора сравнения, в который вместо фермента добавлен буфер.

Расчет

Удельная активность:

$$\frac{A_{546} \times 20 \times \text{объем пробы (1,3 мл)} \times \text{коэффициент разведения}}{\text{объем фермента, мл} \times \text{концентрация белка, мг/мл}}$$

Удельная активность выражается в единицах активности в час.

Литература

Korkes, S.A., Campillo, A., Gunsalus, I.C., Ochoa, S. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 721-735

Reed, L.J., Willms, C.R. (1966) *Meth. Enzymol.* 9, 247-269

Reed, L.J., Leach, F.R., Koike, M. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 123 — 142

3.7.5.3 ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ЛИПОАМИД)

КФ 1.2.4.1, компонент Е1р, пируват:липоамид 2-оксидоредуктаза (декарбоксилирующая и акцептор-ацетилирующая)

А. ФЕРРИЦИАНИЛ В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНОВ

Метод не очень чувствительный, требуется большое количество фермента.

Необходимые растворы

0,05 М Трис-НС1, рН 7,6

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6H₂O, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,1 М пируват (пируват натрия, J/г 110,0; 110 мг в 10 мл)

0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, или кокарбоксилаза, J/г 460,8; 46,1 мг в 10 мл)

0,1 М K₃[Fe(CN)₆] (J/г 329,2; 330 мг в 10 мл)

Реакционная смесь

8,9 мл 0,05 М Трис-НС1, рН 7,6

0,1 мл 0,1 М MgCl₂

0,5 мл 0,1 М пирувата

0,1 мл 0,01 М ТДФ

0,2 мл 0,1 М K₃[Fe(CN)₆]

Концентрация

45 мМ

1,0 мМ

5,0 мМ

0,1 мМ

2,0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за снижением поглощения при 436 нм при 30 °С;

$\epsilon_{436} = 7,55 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Литература

Schwartz, E.R., Old, L.O., Reed, L.J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 495-500

Б. ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛ В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНОВ

Необходимые растворы

0,05 М триэтаноламин • HCl, pH 7,8

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6H₂O, M_с 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,1 М пируват (пируват натрия, A/_г 110,0; 110 мг в 10 мл)

0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, или кокарбоксилаза, M_х 460,8; 46,1 мг в 10 мл)

0,01 М 2,6-дихлорфенолиндофенол (M_х 290,1; 87 мг в 30 мл «-пропанола)

Реакционная смесь	Концентрация
8,7 мл 0,05 М триэтанолamina-HCl, pH 7,8	87 мМ
0,2 мл 0,1 М MgCl ₂	2.0 мМ
0,5 мл 0,1 М пирувата	5.0 мМ
0,2 мл 0,01 М ТДФ	0,2 мМ
0,2 мл 0,01 М 2,6-дихлорфенолиндофенола	0,2 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за изменением поглощения при 600 нм при 30 °С.

Литература

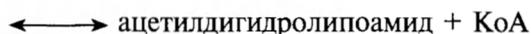
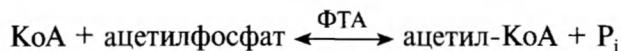
Северин С.Е., Глемжа А.А. (1964) *Биохимия* 29, 1170-1176

Sumegi, B., Alkonyi, I. (1983) *Eur. J. Biochem.* 136, 347-353

3.7.5.4 ДИГИДРОЛИПОАМИДАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗА

КФ 2.3.1.12, компонент E2p пируватдегидрогеназного комплекса, дигидролипоамид S-ацетилтрансфераза, ацетил-КоА: дигидролипоамид S-ацетилтрансфераза

А. СПЕКТРАЛЬНЫЙ МЕТОД



Необходимые растворы

0,1 М Трис-НС1, рН 7,6

0,01 М кофермент А (свободная кислота, M_r 767,5; КоА • Li₃, M_2 785,4; 23 мг в 3 мл)1,0 М ацетилфосфат (соль Li/K, M_r 184,1; 1,84 г в 10 мл)

Фосфотрансацетилаза (ацетил-КоА:ортофосфат ацетилтрансфераза, КФ 2.3.1.8, 4000 МЕ/мл)

0,2 М DL-дигидролипоамид (50 мг в 1,25 мл этанола).

Окисленная форма — DL-дигидролипоамид (амид DL-6,8-тиоктовой кислоты, A_r 205,3) — фирменный препарат. Его можно перевести в восстановленную форму (Reed et al., 1958):2 г DL-липоамида суспендируют в смеси 40 мл этанола и 10 мл воды при 0 °С. На протяжении двух часов постепенно добавляют 2 г NaBH₄. Раствор должен стать бесцветным.При необходимости добавляют дополнительное количество NaBH₄. Раствор подкисляют 5 н. HCl и производят трехкратную экстракцию хлороформом (20 мл). Фракции хлороформа объединяют, трижды промывают водой и высушивают под вакуумом.

Сухой порошок растворяют в 5 мл горячего бензола или толуола, а затем по каплям добавляют петролейный эфир до появления слабой устойчивой мутности. За ночь в холодной комнате должны выпасть кристаллы вещества.

Перекристаллизацию повторяют дважды, конечный продукт должен быть абсолютно белым.

Реакционная смесь

9,38 мл 0,1 М Трис-НС1, рН 7,6

0,2 мл 0,2 М DL-дигидролипоамида

0,1 мл 0,01 М кофермента А

0,1 мл 1,0 М ацетилфосфата

0,02 мл фосфотрансацетилазы

Концентрация

94 мМ

4,0 мМ

0,1 мМ

10 мМ

4 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за изменением поглощения при 240 нм в кварцевых кюветах при 30 °С.

Б. Метод остановки реакции**Необходимые растворы**

0,1 М Трис-НС1, рН 7,6

- 0,01 М кофермент А (свободная кислота, M_r 767,5; $\text{CoA} \cdot \text{Li}_3$, M_r 785,4; 23 мг в 3 мл)
 1,0 М ацетилфосфат (соль Li/K, M_r 184,1; 1,84 г в 10 мл)
 Фосфотрансацетилаза (ацетил-КоА:ортофосфат ацетилтрансфераза, КФ 2.3.1.8, 4000 МЕ/мл)
 0,2 М DL-дигидролипоамид
 1 н.НС1
 2 М гидроксилламин (смешивают равные объемы 4 М гидроксилламина гидрохлорида, M_r 69,49, и 4 М КОН, M_m 56,11)
Реагент FeCl_3 :
 100 мл 5%-ного FeCl_3 (8,33 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M_r 270,3, доводят до 100 мл 0,1 н. раствором НС1)
 100 мл 12% ТХУ (трихлоруксусная кислота, M_r 163,4)
 100 мл 3 М НС1 (смешивают одну часть концентрированной кислоты с тремя частями воды)
 Смешивают вместе три раствора.

Реакционная смесь	Концентрация
8,98 мл 0,1 М Трис-НС1, рН 7,6	90 мМ
0,2 мл 0,01 М кофермента А	0,2 мМ
0,1 мл 1,0 М ацетилфосфата	10 мМ
0,5 мл 0,2 М DL-дигидролипоамида	10 мМ
0,02 мл фосфотрансацетилазы	4 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Смесь инкубируют 15 мин при 30 °С, а затем останавливают реакцию добавлением 0,1 мл 1 н. НС1 и выдерживают 5 мин на кипящей водяной бане. Отбирают аликвоту 0,4 мл, добавляют к ней 0,2 мл 2 М гидроксилламина и выдерживают смесь 10 мин при комнатной температуре. После этого добавляют 0,6 мл реагента FeCl_3 , центрифугируют 5 мин и определяют поглощение раствора при 546 нм.

Расчет

Удельная активность:

$$\frac{A_{546} \times 20 \times \text{объем пробы (1,1 мл)} \times \text{коэффициент разведения}}{\text{объем фермента (мл)} \times \text{концентрация белка (мг/мл)}}$$

Удельная активность выражается в единицах активности в час.

Литература

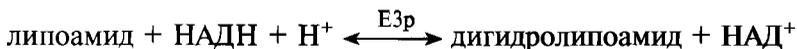
- Hager, L.P., Gunsalus, I.C. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5767-5768
 Reed, L.J., Leach, F.R., Koike, M. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 123-142
 Schwartz, E.R., Reed, L.J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6074-6079
 Willms, C.R., Oliver, R.M., Henney, H.R., Mukhejee, B.B., Reed, L. J. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 889-897

3.7.5.5 ДИГИДРОЛИПОАМИД-ДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.8.1.4, компонент ЕЗр пируватдегидрогеназного комплекса, НАДН:липоамид оксидоредуктаза, диафороаза.

Фермент существует в клетке в виде свободного димера и в составе полиферментных комплексов, таких как комплексы пируватдегидрогеназы, α-оксoglутаратдегидрогеназы и дегидрогеназы α-оксокислот с разветвленной цепью.

Фермент впервые был описан Штраубом в 1939 г; диафороазами называют ферменты, способные катализировать окисление НАД(Ф)Н в присутствии таких акцепторов электронов, как феррицианид, дихлорфенолиндофенол и хиноны.



Данную реакцию можно анализировать в любом направлении. Фирменными препаратами являются липоевая кислота и ее амид в окисленной форме, но их легко перевести в восстановленное состояние (см. разд. 3.7.5.4). В качестве субстрата могут использоваться как кислота, так и ее амид, но по отношению к амиду активность фермента в пять раз выше.

А. Окисление дигидролипоамида**Необходимые растворы**

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

0,1 М НАД⁺ (свободная кислота, M_m 663,4; 663 мг в 10 мл)

0,1 М дитиоэритрит (ДТЭ, M_m 154,2, или дитиотрейтол, ДТТ, M_m 154,2; 154 мг в 10 мл)

0,2 М DL-дигидролипоамид (M_r 207,3; 52 мг в 1,25 мл этанола или ацетона, поскольку это вещество не растворяется в воде в той концентрации, которая нужна для приготовления запасного раствора. В присутствии алкогольдегидрогеназы, например, в грубом экстракте этанол взаимодействует с НАД⁺, в результате чего образуются ацетальдегид и НАДН. Следовательно, присутствие этого фермента необходимо исключить. В противном случае субстрат следует растворить в ацетоне.)

Реакционная смесь	Концентрация
9,46 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5	95 мМ
0,1 мл 0,1 М НАД ⁺	1,0 мМ
0,04 мл 0,1 М ДТЭ	0,4 мМ

Ход определения

0,96 мл реакционной смеси

0,02 мл 0,2 М DL-дигидролипоамида (4,0 мМ)

0,02 мл фермента

Следят за изменением поглощения при 340 нм (30 °С).

Для расчетов используют коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\text{ см}^{-1}$.

Б. Восстановление липоамида

Для осуществления этой реакции в реакционной смеси должен присутствовать не только НАДН, но и НАД⁺, предотвращающий избыточное восстановление и инактивацию фермента.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

0,1 М НАД⁺ (свободная кислота, M_z 663,4; 663 мг в 10 мл)

0,01 М НАДН (двунатриевая соль, M_z 709,4; 71 мг в 10 мл)

0,1 М дитиозэритрит (ДТЭ, M_T 154,2, или дитиотрейтол, ДТТ, M_T 154,2; 154 мг в 10 мл)

0,1 М ЭДТА (M_m 292,2; 292 мг в 10 мл)

0,2 М DL-липоамид (амид 6,8-тиоктовой кислоты, M_T 205,3; 51 мг в 1,25 мл этанола или ацетона, см. метод А.)

Реакционная смесь	Концентрация
9,06 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5	91 мМ
0,1 мл 0,1 М НАД ⁺	1,0 мМ
0,02 мл 0,01 М НАДН	0,02 мМ
0,1 мл 0,1 М ЭДТА	1,0 мМ
0,02 мл 0,1 М ДТЭ	0,2 мМ

Ход определения

0,93 мл реакционной смеси

0,05 мл 0,2 М DL-липоамида 10 мМ

0,02 мл фермента

Следят за изменением поглощения при 340 нм (30 °С);

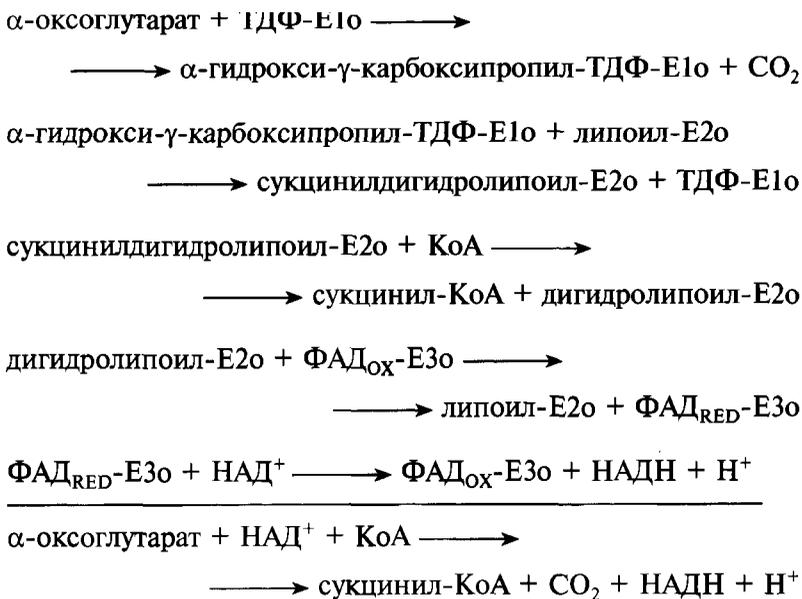
$\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\text{ см}^{-1}$.

Литература

- Reed, L.J., Willms, C.R. (1966) *Meth. Enzymol.* 9, 247-269
 Reed, L.J., Koike, M., Levitch, M.E., Leach, F.R., (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 143-158
 Schwartz, E.R., Reed, L.J. (1970) *Biochemistry* 9, 1434-1439
 Straub, F.B. (1939) *Biochem. J.* 33, 787-792
 Willms, C.R., Oliver, R.M., Henney, H.R., Mukhetjee, B.B., Reed, L.J. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 889-897

3.7.6 α -Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (ОГДГК)

Данный комплекс по своей структуре и осуществляемым реакциям напоминает пируватдегидрогеназный комплекс. Он также состоит из нескольких (24) идентичных копий трех компонентов — α -оксоглутаратдегидрогеназы (E1₀, КФ 1.2.4.2), дигидролипоамидсукцинилтрансферазы (E2₀, КФ 2.3.1.61) и дигидролипоамид-дегидрогеназы (E3₀, КФ 1.8.1.4). Комплекс катализирует следующую последовательность реакций:



Методы анализа очень похожи на те, что были приведены для пируватдегидрогеназного комплекса, и они также могут использоваться для изучения как процесса в целом, так и отдельных стадий (следует лишь заменить пируват α -оксоглутаратом, т.е. ацетильную группу заменить сукцинильной). Поэтому в данном

разделе приводятся лишь методы анализа процесса в целом по восстановлению НАД и реакция E1o с феррицианидом в качестве акцептора электронов. Поскольку E3o и E3p — это один и тот же фермент, для его анализа можно использовать описанный выше метод.

3.7.6.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ ОГДГК ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ НАД*

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,6

0,1 М НАД⁺ (свободная кислота, M_r 663,4; 663 мг в 10 мл)

0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, или кокарбоксилаза, M_m 460,8; 46,1 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂* 6H₂O, M_m 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,5 М α-оксоглутарат (α-кетоглутарат, двунариевая соль, M_r 190,1; 0,95 г в 10 мл)

0,1 М дитиозэритритол (ДТЭ, M_m 154,2, или дитиотрейтол, ДТТ, M_m 154,2; 154 мг в 10 мл)

0,01 М кофермент А (свободная кислота, M_m 767,5; КоА* Li₃, M_m 785,4; 23 мг в 3 мл)

Реакционная смесь

7,95 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,6

0,25 мл 0,1 М НАД⁺

0,20 мл 0,01 М ТДФ

0,1 мл 0,1 М MgCl₂

0,1 мл 0,5 М α-оксоглутарата

0,1 мл 0,1 М ДТЭ

0,1 мл 0,01 М кофермента А

Концентрация

80 мМ

2,5 мМ

0,2 мМ

1,0 мМ

5,0 мМ

1,0 мМ

0,1 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за изменением поглощения при 340 нм (37 °С); коэффициент поглощения НАДН $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹.

Литература

Stepp, L.R., Bleile, D.M., McRorie, D.K., Pettit, F.H., Reed, L.J. (1981) *Biochemistry* 20, 4555-4560

3.7.6.2 α -ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗА

КФ 1.2.4.2, α -оксоглутаратдегидрогеназа, компонент E1o.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 6,5

0,1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M_m 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,5 М α -оксоглутарат (α -кетоглутарат, M_m 190,1; 0,95 г в 10 мл)

0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, кокарбоксилаза, M_2 460,8; 46,1 мг в 10 мл)

0,1 М $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (M_2 329,2; 330 мг в 10 мл)

Реакционная смесь

8,1 мл 0,1 фосфата калия, pH 6,5

0,2 мл 0,1 М MgCl_2

0,2 мл 0,01 М ТДФ

1,0 мл 1% БСА

0,1 мл 0,5 М α -оксоглутарата

0,2 мл 0,1 М $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Концентрация

81 мМ

2.0 мМ

0,2 мМ

0,1%

5.0 мМ

2.0 мМ

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за снижением поглощения при 436 нм при 30 °С;

$\epsilon_{436} = 755 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

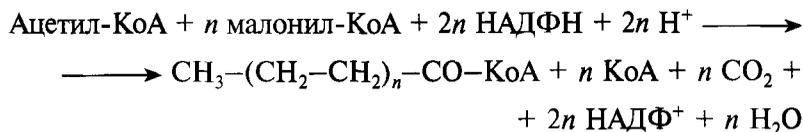
Литература

Hager, L.P., Gunsalus, I.C. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5767-5768

3.7.7 Трансферазы

3.7.71 СИНТАЗА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

КФ 2.3.1.85, ацил-КоА:малонил-КоА С-ацилтрансфераза (декарбоксилирующая, оксоацил- и еноил-восстанавливающая и тиоэфир-гидролизующая).



где л = 6-8.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 6,5

0,1 М ЭДТА (M_2 292,2; 292 мг в 10 мл)

0,1 М дитиоэритрит (ДТЭ, M_r 154,2, или дитиотрейтол, ДТТ, M_2 154,2; 154 мг в 10 мл)

0,01 М ацетил-КоА (соль Li_3 , M , 827,4; 8,3 мг/мл)

0,007 М малонил-КоА (соль Li_4 , M_2 877,3; 6,1 мг/мл)

0,01 М НАДФН (M_r 833,4; 83 мг в 10 мл)

2,4% БСА (240 мг в 10 мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,64 мл 0,1 М фосфата калия, pH 6,5	86 мМ
0,25 мл 0,1 М ЭДТА	2.5 мМ
0,25 мл 0,1 М ДТЭ	2.5 мМ
0,25 мл 2,4% БСА	0,06%
0,06 мл 0,01 М ацетил-КоА	0,06 мМ
0,15 мл 0,01 М НАДФН	0,15 мМ

Ход определения

0,96 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С) на протяжении 3-4 мин. Реакцию начинают добавлением 0,02 мл 0,007 М малонил-КоА (0,14 мМ). Следят за снижением поглощения при 340 нм; коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

Литература

Lynen, F. (1969) *Meth. Enzymol.* 14, 17-33

3.7.7.2 ФОСФОРИЛАЗА а

КФ 2.4.1.1, 1,4-а-Б-глюкан:ортофосфат а-D-глюкозилтрансфераза.

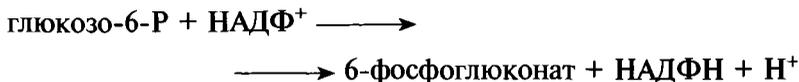
Фермент расщепляет а-1,4-глюкозидные связи в полисахаридах:



Для проведения анализа эту реакцию сопрягают с реакцией, катализируемой фосфоглюкомутазой:



и глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназой:



Необходимые растворы

0,05 М фосфат калия, рН 6,8

0,01 М ЭДТА (M_r 292,2; 29,2 мг в 10 мл)

Гликоген (60 мг в 10 мл)

1 мМ глюкозо-1,6-дифосфат (соль тетрациклогексиламмония,
 M_m 736,8; 7,4 мг в 10 мл)

0,01 М НАДФ (M_r 787,4; 79 мг в 10 мл)

1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M , 203,3; 2 г в 10 мл)

Фосфоглюкомутаза, 100 МЕ/мг (раствор 100 МЕ/мл)

Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа, 200-400 МЕ/мг (раствор
300 МЕ/мл)

Оба ферментных препарата необходимо очистить от следов солей аммония. Если используют суспензии в солях аммония, необходимо предварительно провести диализ против 0,05 М раствора фосфата калия, рН 6,8.

Реакционная смесь

8,5 мл 0,05 фосфата калия, рН 6,8

0,1 мл 0,01 М ЭДТА

0,3 мл гликогена

0,05 мл 1 мМ глюкозо-1,6-дифосфата

0,4 мл 0,01 М НАДФ

0,15 мл 1 М MgCl_2

0,1 мл фосфоглюкомутазы

0,2 мл глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы

Концентрация

42,5 мМ

0,1 мМ

0,18 мг/мл

0,005 мМ

0,4 мМ

15 мМ

1 МЕ/мл

6 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С); коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹.

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, pp. 293-295, Verlag Chemie, Weinheim
- Helmreich, E. Michaelides, M.C., Con, C.F. (1967) *Biochemistry* 6, 3695-3710

Реакционная смесь	Концентрация
5,8 мл 0,1 М триэтанолламин • HCl/NaOH, pH 7,6	58 мМ
0,6 мл 0,1 М MgCl ₂	6 мМ
2,0 мл 1,0 М D-глюкозы	200 мМ
1,0 мл 10 мМ НАДО	1 мМ
0,3 мл 0,1 М АДФ	3 мМ
0,1 мл глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы	0,5 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С); коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, pp. 222-223, Verlag Chemie, Weinheim
- Darrow, R.A., Colowick, S.P. (1962) *Meth. Enzymol.* 5, 226-235
- Rose, I.A., Rose, Z.B. (1969) *Comprehensive Biochem.* 17, 93-161

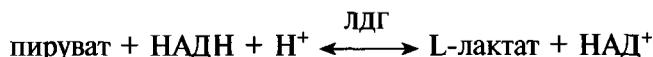
3.7.7.4 ПИРУВАТКИНАЗА

КФ 2.7.1.40, ПК, АДФ:пируват фосфотрансфераза

Как и для других киназ, прямой анализ реакции



может осуществляться с помощью меченого фосфора (³Р). Здесь приведен метод с использованием сопряженной реакции с участием ЛДГ, который позволяет детектировать окисление НАДН спектрофотометрически:

**Необходимые растворы**

- 0,1 М триэтанолламин • HCl/NaOH, pH 7,6 (триэтанолламин-HCl, M_m 185,7; 18,6 г разводят в 800 мл воды, доводят до pH 7,6 раствором 1 н. NaOH и доводят объем до 1 л)
- 0,5 М KCl (M_m 74,6; 373 мг в 10 мл)
- 0,25 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6H₂O, M_m 203,3; 508 мг в 10 мл)
- 0,01 М фосфоенолпируват (ФЕП, соль трициклогексиламмония, M_r 465,6; 46,6 мг в 10 мл)
- 0,1 М АДФ (двунариевая соль, M_r 471,2; 471 мг в 10 мл)

0,01 М НАДН (двунатриевая соль, A_f 709,4; 71 мг в 10 мл)
 ЛДГ (фирменные препараты имеют активность около 500 МЕ/мг,
 необходимо приготовить раствор с активностью около
 150 МЕ в 0,1 мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,2 мл 0,1 М триэтаноламин-HCl/NaOH, pH 7,6	82 мМ
0,2 мл 0,5 М KCl	10 мМ
0,1 мл 0,25 М $MgCl_2$	2,5 мМ
0,5 мл 0,01 М ФЕП	0,5 мМ
0,5 мл 0,1 М АДФ	5 мМ
0,2 мл 0,01 мМ НАДН	0,2 мМ
0,1 мл ЛДГ	15 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С); коэф-
 фициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

Литература

- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bucher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E.,
 Pfeleiderer, G. (1953) *Zeitschrift für Naturforschung* 8b, 555-577
 Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, p. 303, Verlag Chemie,
 Weinheim
 Bucher, T., Pfeleiderer, G. (1955) *Meth. Enzymol.* 1, 435-440
 Rose, I.A., Rose, Z.B. (1969) *Comprehensive Biochem.* 17, 93-161

3.77.5 АЦЕТАТКИНАЗА

КФ 2.7.2.1, АК, АТФ:ацетат фосфотрансфераза

ацетат + А1Ф \longleftrightarrow ацетилфосфат + АДФ

Для проведения анализа данную реакцию сопрягают с реак-
 циями, катализируемыми пируваткиназой (ПК) и лактатдегид-
 рогеназой (ЛДГ):

фосфоенолпируват + АДФ $\xrightleftharpoons{ПК}$ пируват + АТФ

пируват + НАДН + Н⁺ $\xrightleftharpoons{ЛДГ}$ L-лактат + НАД⁺

Необходимые растворы

0,1 М триэтаноламин • HCl/NaOH, pH 7,6 (триэтаноламин-
 HCl, доводят pH раствором 1 н. NaOH)

2,0 М ацетат натрия (M_m 82,0; 16,4 г в 100 мл)
 0,1 М АТФ (двунариевая соль, тригидрат, M_m 605,2; 605 мг в 10 мл)
 0,1 М $MgCl_2$ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$, M_x 203,3; 203 мг в 10 мл)
 0,01 М НАДН (двунариевая соль, M_i 709,4; 71 мг в 10 мл)
 0,01 М фосфоенолпируват (ФЕП, соль трициклогексиламмония, M_m 465,6; 46,6 мг в 10 мл)
 ЛДГ (20 мг/мл, около 500 МЕ/мг)
 ПК (10 мг/мл, 500 МЕ/мг)

Реакционная смесь	Концентрация
6,3 мл 0,1 М триэтаноламин-НСI/NaOH, pH 7,6	63 мМ
1,5 мл 2,0 М ацетата натрия	0,3 М
0,5 мл 0,1 М АТФ	5,0 мМ
0,15 мл 0,1 М $MgCl_2$	1,5 мМ
1,0 мл 0,01 М ФЕП	1,0 мМ
0,3 мл 0,01 мМ НАДН	0,3 мМ
0,025 мл ЛДГ	25 МЕ/мл
0,015 мл ПК	7,5 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

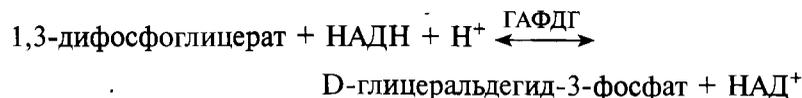
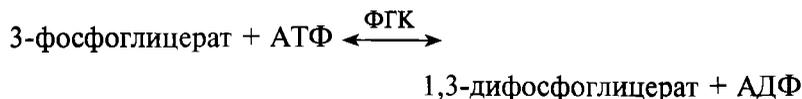
Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С); коэффициент поглощения = $6,3 \cdot 10^3$ л моль⁻¹·см⁻¹.

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, pp. 127-128, Verlag Chemie, Weinheim
 Rose, I.A., Grunberg-Manago, M., Korey, S.R. (1954) *J. Biol. Chem.* 211, 737-756

3.7.7.6 3-ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗА

КФ 2.7.2.3; ФГК, АТФ:3-фосфо-0-глицерат 1-фосфотрансфераза.



Необходимые растворы

0,1 М триэтанолламин-НСI/NaOH, рН 7,6 (триэтанолламин-НСI, M_T 185,7; 18,6 г растворяют в 800 мл воды, доводят до рН 7,6 раствором 1 н. NaOH и доводят объем до 1 л)

0,1 М 3-фосфоглицерат (двунариевая соль, M_2 230,0; 230 мг в 10 мл)

0,1 М АТФ (двунариевая соль, тригидрат, M_T 605,2; 605 мг в 10 мл)

0,01 М НАДН (двунариевая соль, M_m 709,4; 71 мг в 10 мл)

0,1 М ЭДТА (M_m 292,2; 292 мг в 10 мл)

0,1 М $MgSO_4$ ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, M_T 246,5; 247 мг в 10 мл)

3-Фосфоглицераткиназа (из дрожжей, около 2000 МЕ/мг)

ГАФДГ (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа из мышц кролика, 800 МЕ/мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,67 мл 0,1 М триэтанолламин-НСI/NaOH, рН 7,6	87 мМ
0,5 мл 0,1 М 3-фосфоглицерата	5.0 мМ
0,1 мл 0,1 М АТФ	1.0 мМ
0,2 мл 0,01 мМ НАДН	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М ЭДТА	1.0 мМ
0,2 мл 0,1 М $MgSO_4$	2.0 мМ
0,03 мл ГАФДГ	2,4 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл фермента

Следят за снижением поглощения при 340 нм (25 °С); коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

Литература

Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, pp. 280-281, Verlag Chemie, Weinheim

Bucher, T. (1955) *Meth. Enzymol.* 1, 415-422

Rose, I.A., Rose, Z.B. (1969) *Comprehensive Biochem.* 17, 93-161

3.7.8 Гидролазы

3.7.8.1 ЛИПАЗА

КФ 3.1.1.3; триацилглицеролацилгидролаза

триацилглицерин \longrightarrow глицерин +

+ длинноцепочечная жирная кислота

Высвобождение карбоксильных групп приводит к снижению рН, что можно использовать для анализа этой реакции. Для поддержания уровня рН в процессе реакции рекомендуется использовать рН-стат, соединенный с автоматической бюреткой. Кроме того, за активностью фермента можно наблюдать с помощью флуориметра по высвобождению флуоресцентной метки из синтетического субстрата.

А. Метод рН-стагирования

Необходимые растворы

3,0 М хлорид натрия (NaCl , M_r 58,4; 17,5 г в 100 мл)

75 мМ хлорид кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; M_r 219,1; 1,62 г в 100 мл)

5 мМ хлорид кальция (75 мМ раствор хлорида кальция разводят в 15 раз)

0,5%-ный бычий сывороточный альбумин (БСА, для липазы из дрожжей)

27 мМ таурохолат натрия (для липазы из тканей свиньи, M_m 537,7; 1,45 г в 100 мл)

Эмульсия оливкового масла/гуммиарабика; растворяют 16,5 г гуммиарабика в 130 мл воды и доводят объем до 165 мл; добавляют 20 мл оливкового масла и 15 г дробленого льда, смешивают в блендере на малых оборотах до образования эмульсии; фильтруют через стекловату.

Липаза (запасной раствор: 1 мг/мл в 5 мМ хлориде кальция, далее для анализа разбавляют 5 мМ хлоридом кальция)

0,01 М NaOH — стандартный раствор для заполнения бюретки автотитратора.

Реакционная смесь и ход определения

5 мл эмульсии оливкового масла/гуммиарабика

5 мл H_2O

2 мл 3,0 М NaCl

1 мл 75 мМ хлорида кальция

2 мл 0,5% БСА (для липазы из дрожжей) или 27 мМ таурохолата натрия (для липазы свиньи)

15 мл, довести до рН 8,0

Раствор сравнения: на протяжении 3 мин регистрируют объем титрующего раствора в единицу времени.

Образец: к реакционной смеси добавляют необходимое количество разбавленного фермента (в соответствии с его

активностью) и на протяжении 5 мин регистрируют объем титрующего раствора, добавляемого автотитратором в единицу времени.

Расчет

Одна единица активности соответствует 1 мкмоль жирной кислоты, высвобождаемой из эмульсии оливкового масла за 1 мин при 25 °С и pH 8,0.

Литература

- Desnuelle, P. (1972) *The Enzymes*, 3rd edn. Boyer, P. (ed.) Vol. 7, p. 575, Academic Press, New York
- Lagocki, J.W., Low, J.H., Kezdy, F.J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 580-587
- Sarda, L., Marchis-Mouren, G., Constantin, M.J., Denuelle, P. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 23, 264-274

Б. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД

Этот метод применим также для анализа реакций, катализируемых химотрипсином, холинэстеразой и ацилазой. В случае холинэстеразы вместо флуоресцеиндибутирата в качестве субстрата можно использовать флуоресцеиндиацетат.



Необходимые растворы

0,1 М Трис-НС1, pH 8,0

0,05 мМ флуоресцеиндибутират (M_T 472,5; 2,36 г растворяют в смеси 5 мл монометилового эфира этиленгликоля (метилцеллозольв) и 95 мл 0,1 М Трис-НС1, pH 8,0 — раствор субстрата)

Ход определения

К 2,9 мл раствора субстрата добавляют 0,1 мл раствора фермента. Измеряют флуоресцентное излучение при длине волны 510 нм (длина волны возбуждающего света 470 нм).

Литература

- Guilbault, G.G., Kramer, D.N. (1963) *Anal. Chem.* 35, 588-589
- Guilbault, G.G., Kramer, D.N. (1964) *Anal. Chem.* 36, 409-412
- Oosterbaum, R.A., Jansz, H.S. (1965) *Comprehensive Biochem.* 16, 1-54

3.7.8.2 ХОЛИНЭСТЕРАЗА

КФ 3.1.1.8, ацилхолин-ацилгидролаза, псевдохолинэстераза, бутирилхолинэстераза (БХЭ)

Для анализа холинэстеразы также можно использовать методы, предлагаемые для анализа ацетилхолинэстеразы и липазы. Кроме приведенных выше методов, описан также манометрический метод, основанный на определении CO_2 . Метод с применением рН-стата, описанный здесь для анализа ацетилхолинэстеразы, может использоваться и с бутирилхолином:



Фермент гидролизует бутирилхолин в 2,5 раза быстрее ацетилхолина. Для анализа лучше всего пользоваться рН-статом или рН-метром, с помощью которых определяют количество основания, необходимого для нейтрализации уксусной кислоты. Ниже также описан колориметрический метод анализа.

А. Метод рН-статирования

Необходимые растворы

0,02 М Трис-НС1, рН 7,4

2,2 М хлорид ацетилхолина (M_r 181,7; 40 г в 100 мл, или иодид бутирилхолина, M_m 301,3)

0,2 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, M_m 203,3; 4,1 г в 100 мл воды)

0,01 М NaOH — стандартный раствор для заполнения бюретки автотитратора

Холинэстераза, готовят водный раствор 1 мг/мл

Реакционная смесь и ход определения

7.0 мл H_2O

3.0 мл 0,2 М хлорида магния

3.0 мл 0,02 М Трис-НС1, рН 7,4

1 мл 2,2 М хлорида ацетилхолина

Концентрация

43 мМ

4,3 мМ

157 мМ

14 мл, доводят до рН 7,4 (25 °С)

Раствор сравнения: на протяжении 3 мин регистрируют расход 0,01 М гидроксида натрия, необходимого для поддержания рН 7,4, в единицу времени.

Образец: к реакционной смеси добавляют раствор фермента (например, 0,1-1 мл) и на протяжении 5 мин регистрируют объем 0,01 М гидроксида натрия, необходимого для поддержания рН 7,4, в единицу времени.

Расчет

Одна единица активности соответствует количеству фермента, гидролизующего 1 мкмоль/мин ацетилхолина при 25 °С и рН 7,4.

$$\text{МЕ/мг} = \frac{(\text{мл основания/мин} \times \times \text{нормальность основания} \times 1000)}{\text{мг фермента в реакционной смеси}}$$

Б. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

индофенилацетат-----► индофенол + уксусная кислота

Цвет реакционной смеси меняется с красного на синий.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 8,0

0,62 мМ индофенилацетат (0,375 г в 25 мл этанола)

Реакционная смесь и ход определения

0,68 мл 0,1 М фосфата калия, рН 8,0

0,3 мл 0,62 мМ индофенилацетата

0,02 мл фермента

Концентрация

68 мМ

0,19 мМ

Измеряют поглощение при длине волны 625 нм при 25 °С и определяют активность фермента с помощью калибровочной кривой.

Литература

Augustinson, K.B., Olsson, B. (1959) *Biochem. J.* 71, 477-484

Ellmann G.L. (1961) *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95

Glick, D. (1937) *Biochem. J.* 31, 521-525

Goodson, L.H., Jacobs, W.B. (1973) *Anal. Biochem.* 51, 362-367

Koelle, G. (1953) *Biochem. J.* 53, 217-226

Kramer, D.N., Gamson, R.M. (1958) *Anal. Chem.* 30, 251-254

Main, R., Soucie, W.C., Buxton, I.L., Amic, E. (1974) *Biochem. J.* 143, 733-744

Nachmanson, D.W., Wilson, J.B. (1951) *Adv. Enzymol.* 12, 259-339

3.7.8.3 АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА

КФ 3.1.1.7, АХЭ, ацетилхолингидролаза

ацетилхолин + Н₂О —————► холин + уксусная кислота

Некоторые методы анализа приведены в разд. 3.7.8.2, посвященном холинэстеразе. Здесь представлен метод с использованием рН-стата или рН-метра, основанный на определении количества основания, необходимого для нейтрализации образующейся уксусной кислоты.

Необходимые растворы

0,02 М фосфат калия, рН 7,0

5 мМ хлорид ацетилхолина (M_m 181,7; 91 мг в 100 мл)

0,01%-ный желатин, содержащий 0,2 М хлорид натрия и 0,04 М хлорид магния (0,1 г желатина, 11,7 г NaCl и 8,1 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ в 1 л воды)

0,01 М NaOH, стандартный раствор для заполнения бюретки автотитратора

Ацетилхолинэстераза, разводят 0,02 М раствором фосфата калия, рН 7,0, до активности ~ 20 МЕ/мл

Реакционная смесь и ход определения

7.5 мл 5 мМ ацетилхолина

7.5 мл 0,01%-ного желатина

Концентрация

2,5мМ

0,005%

15 мл, доводят до рН 7,0 (25 °С)

Раствор сравнения: на протяжении нескольких минут записывают расход 0,01 М гидроксида натрия, необходимого для поддержания рН 7,0, в единицу времени.

Образец: к реакционной смеси добавляют раствор фермента (0,1-1 мл) и на протяжении 5 мин регистрируют объем 0,01 М гидроксида натрия, необходимого для поддержания рН 7,0, в единицу времени.

Расчет

Одна единица активности соответствует количеству фермента, гидролизующего 1 мкмоль/мин ацетилхолина при 25 °С и рН 7,0.

$$\text{МЕ/мг} = \frac{(\text{мл основания/мин} \times \text{нормальность основания} \times 1000)}{\text{мг фермента в реакционной смеси}}$$

Литература

- Froede, H.C., Wilson, I.B. (1971) *The Enzymes*, 3rd edn. Boyer, P.D. (ed.), Vol. 5, pp. 87-114, Academic Press, New York
- Oosterbaum, R.A., Jansz, H.S. (1965) *Comprehensive Biochem.* 16, 1-54
- Reed, D.L., Goto, K., Wang, C.H. (1966) *Anal. Biochem.* 16, 59-64

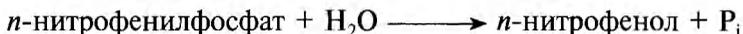
3.7.8.4 ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА

КФ 3.1.3.1, фосфомоноэстераза с щелочным оптимумом рН, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (щелочной оптимум)

моноэфир ортофосфорной кислоты + H₂O -----► спирт + P_i

Фермент выделяют из различных источников, например, из бактерий или слизистой кишечника млекопитающих. Каждая молекула

фермента содержит два связанных иона цинка Zn^{2+} . Щелочную фосфатазу часто используют в виде конъюгатов с антителами, например, для Вестерн блота или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Оптимум pH бактериального фермента приходится на 8,0, а у ферментов млекопитающих он еще выше — от 9,0 до 10,0. Приведенные ниже методы анализа основаны на развитии желтой окраски в процессе следующей реакции:



Кроме того, как описано далее для кислой фосфатазы, в качестве субстрата можно использовать о-карбоксифенил фосфат в щелочной среде.

А. ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Необходимые растворы

0,1 М глицин-КОН, pH 10,5, 1 мМ Mg^{2+} , 0,1 мМ Zn^{2+} (растворяют 7,5 г глицина, 203 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ и 14 мг $ZnCl_2$ в 750 мл воды, доводят до pH 10,5 раствором 1 н. КОН и доводят до 1 л водой)

0,5 М /p-нитрофенилфосфат (двунариевая соль, гексагидрат, M_r 371,1; 1,86 г в 10 мл)

Ход определения

0,97 мл 0,1 М глицин-КОН, pH 10,5

0,01 мл 0,5 М и-нитрофенилфосфата

0,02 мл раствора фермента

Следят за ростом поглощения при 405 нм (25 °С); $\epsilon_{405} = 18,5 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Концентрация

97 мМ

5,0 мМ

Б. ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА БАКТЕРИЙ (*Escherichia coli*)

Необходимые растворы

0,5 М Трис-НС1, pH 8,2

6,6 мМ нитрофенилфосфат (двунариевая соль, гексагидрат, M_r 371,1; растворяют 49 мг в 20 мл 0,5 М Трис-НС1, pH 8,2)

Ход определения

0,98 мл 6,6 мМ нитрофенилфосфата

0,02 мл раствора фермента

Следят за ростом поглощения при 405 нм (25 °С); $\epsilon_{405} = 18,5 \cdot 10^3 \text{ л моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Концентрация

(6,5 мМ)

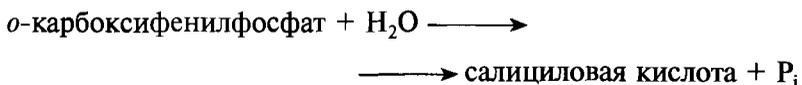
Литература

- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Broch, M.J. (1946) *J. Biol. Chem.* 164, 321-329
 Garen, A., Levinthal, C. (1960) *Biochem. Biophys. Acta* 38, 470-483
 Stadtman, T.C. (1961) *The Enzymes*, 2nd edn. Boyer, P.D., Lardy, H.A., Myrback, K. (eds.), Vol. 5, pp. 55-71, Academic Press, New York
 Morton, R.K. (1965) *Comprehensive Biochem.* 16, 55-84
 Femley, K.N., Walker, P.G. (1967) *Biochem. J.* 104, 1011-1018
 Torriani, A. (1968) *Meth. Enzymol.* 12B, 212-218
 Femley, K.N. (1971) *The Enzymes*, Boyer, P.D. (ed.), Vol. 4, pp. 417-447, Academic Press, New York

3.7.8.5 КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА

КФ 3.1.3.2; фосфомоноэстераза с кислым оптимумом pH, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (кислый оптимум)

Оптимум действия фермента приходится примерно на pH 5,5. Для анализа можно использовать метод, описанный для щелочной фосфатазы с нитрофенилфосфатом, но в кислых условиях.



Необходимые растворы

0,15 М ацетат натрия, pH 5,0 (8,55 мл 100%-ной уксусной кислоты, M_c 60, разводят в 800 мл воды, доводят до pH 5,0 раствором 1 н. NaOH, доводят до 1 л)

3,65 мМ о-карбокисфенилфосфат (фосфосал, фосфат салициловой кислоты, M_x 218,1; 80 мг в 100 мл)

Ход определения

0,7 мл 0,15 М ацетатного буфера, pH 5,0

0,2 мл 3,65 мМ о-карбокисфенилфосфата

3 мин при 25 °C

0,1 мл раствора фермента

Следят за изменением поглощения при 300 нм (25 °C); коэффициент поглощения салициловой кислоты $\epsilon_{300} = 3500 \text{ л-моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Литература

- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Broch, M.J. (1946) *J. Biol. Chem.* 164, 321-329
 Brouillard, J., Quellet, L. (1965) *Can. J. Biochem.* 43, 1899-1905
 Hofstee, B.H.J. (1954) *Arch. Biochem. Biophys.* 51, 139 — 146
 Hollander, V.P. (1971) *The Enzymes*, Boyer, P. D. (ed.), Vol. 4, pp. 449-498, Academic Press, New York

3.7.8.6 РИБОНУКЛЕАЗА (ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ)

КФ 3.1.27.5; РНКаза I

Фермент расщепляет РНК на 3'-моонуклеотидфосфаты и 3'-олигонуклеотидфосфаты, заканчивающиеся на Ср или Ур, с образованием 2',3'-циклических производных.

Необходимые растворы

0,1 М ацетатный буфер, рН 5,0 (5,7 мл 100%-ной уксусной кислоты, M_7 60, разводят в 800 мл воды, доводят до рН 5,0 раствором 1 н. NaOH, доводят до 1 л)

Раствор уранилацетата/перхлората (0,75%-ный уранилацетат в 25%-ной хлорной кислоте)

Раствор РНК из дрожжей (50 мг в 10 мл буферного 0,1 М ацетата натрия, рН 5,0)

РНКаза (1 мг/мл, перед использованием разводят в 100 раз 0,1 М ацетатом натрия, рН 5,0)

Ход определения

0,6 мл 1%-ного раствора РНК

0,1 мл раствора фермента (в растворе сравнения — 1,0 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,0)

Инкубируют 4 мин при 37 °С и останавливают реакцию добавлением

0,3 мл раствора уранилацетата/перхлората

Помещают на лед на 5 мин, центрифугируют 5 мин

Отбирают 0,1 мл супернатанта и добавляют к нему 0,9 мл воды

Измеряют увеличение поглощения при 260 нм.

Расчет

Одна единица ферментативной активности соответствует количеству фермента, которое вызывает изменение поглощения на 1 единицу в указанных условиях при 37 °С и рН 5,0.

Литература

Kalinsky, G., Hummel, J.P., Dierks, C. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1512-1516
Kunitz, M. (1946) *J. Biol. Chem.* 164, 563-568

3.7.8.7 α -АМИЛАЗАКФ 3.2.1.1; 1,4- α -О-глюкан глюканогидролаза

Фермент расщепляет крахмал до восстанавливающих сахаров и мальтозы. Оптимум рН для ферментов из разных источников

различен; здесь описан метод анализа фермента из поджелудочной железы. Фермент из *Bacillus subtilis* наиболее активен при pH 5,5, так что для него необходимо использовать другую буферную систему.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,0

10 мМ мальтоза (моногидрат, M_m 360,3; 36 мг в 10 мл)

Раствор крахмала (0,5 г растворимого крахмала и 17,5 мг NaCl растворяют в 50 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,0, при кипячении)
Динитросалицилат (3,5-динитросалициловая кислота, 2-гидрокси-3,5-динитробензойная кислота, M_m 228,1; 1 г растворяют в 20 мл 2 н. NaOH и 50 мл воды, там же растворяют 30 г тартрата K/Na и доводят объем водой до 100 мл)

Ход определения

0,05 мл раствора крахмала

0,05 мл раствора фермента (разведенного 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,0)

Инкубируют 5 мин при 25 °С

0,1 мл динитросалицилата

Перемешивают 10 мин при 100 °С

Добавляют 1 мл H₂O

Измеряют поглощение при 546 нм.

Активность фермента определяют по калибровочной кривой. Для построения кривой определенные количества раствора мальтозы (от 4 до 30 мкл) разбавляют водой до объема 0,1 мл, а затем к каждой пробе добавляют 0,1 мл динитросалицилата. Прогревают 10 мин при 100 °С и добавляют 1 мл воды. Измеряют поглощение при 546 нм.

Расчет

Одна единица ферментативной активности соответствует количеству фермента, которое вызывает образование 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на мальтозу) в минуту из раствора крахмала при 25 °С и pH 7,0.

Литература

Bemfeld, P. (1951) *Adv. Enzymol.* 12, 379-428

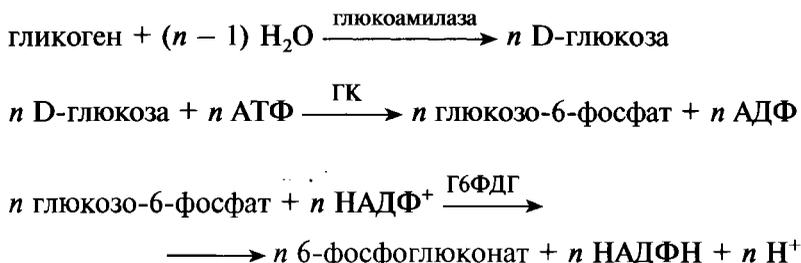
Fischer, E.H., Stein, E.A. (1960) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 4, pp. 313-343, Academic Press, New York

Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, pp. 151-152, Verlag Chemie, Weinheim

3.7.8.8 ГЛЮКОАМИЛАЗА

КФ 3.2.1.3; 1,4-а-О-глюкан глюкогидролаза, глюкан 1,4-а-глюкозидаза, амилоглюкозидаза.

Фермент высвобождает Р-D-глюкозу, расщепляя концевые 1,4- и а-1,6-глюкозидные связи. Анализ ферментативной активности аналогичен анализу, описанному для а-глюкозидазы, за исключением того, что вместо крахмала в качестве субстрата используют гликоген. Через определенный промежуток времени (5 мин) реакцию останавливают и определяют содержание глюкозы с помощью сопряженных реакций гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы:



Необходимые растворы

0,1 М ацетата натрия, рН 4,0 (5,7 мл 100%-ной уксусной кислоты, M_2 60, разводят в 800 мл воды, доводят до рН 4,0 раствором 1 н. NaOH, доводят до 1 л)

Раствор гликогена (80 мг гликогена из устриц в 10 мл)

0,3 М Трис (M_r 121,1; 363 мг в 10 мл)

Ход определения

0,54 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,0

0,25 мл раствора гликогена

0,01 мл раствора фермента

Инкубируют 5 мин при 25 °С, а затем останавливают реакцию добавлением 0,2 мл 0,3 М Трис. Определяют содержание глюкозы (по отношению к раствору сравнения), как это описано для а-глюкозидазы.

Литература

Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, pp. 154-155, Verlag Chemie, Weinheim

37.8.9 ЛИЗОЦИМ

КФ 3.2.1.17; мукопептид—N-ацетилмурамоилгидролаза, мурамидаза.

Фермент осуществляет гидролиз 1,4-р-связей между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и M-ацетил-β-глюкозамина в молекулах пептидогликанов (кроме того, обладает слабой хитиназной активностью).

За активностью фермента наблюдают по изменению мутности среды в результате лизиса бактерии *Micrococcus lysodeikticus* (*M. luteus*).

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,0

Суспензия 10 мг лиофилизированных клеток *Micrococcus lysodeikticus* в 50 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,0

Ход определения

0,98 мл суспензии *Micrococcus lysodeikticus*

0,02 мл раствора фермента (с активностью около 500 МЕ/мл)

Следят за изменением поглощения (мутности) при 450 нм (25 °С) на протяжении 5 мин.

Расчет

$$\text{ед./мг} = \frac{\text{изменение поглощения/мин} \times 1000}{\text{мг фермента в реакционной смеси}}$$

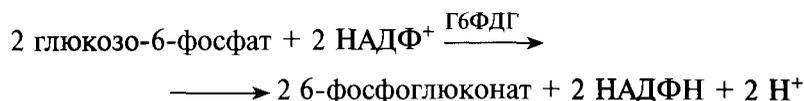
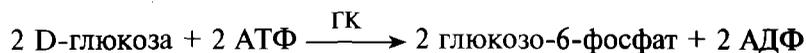
Литература

- Bergmeyer, H.U. (1984) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 4, pp. 189-195, Verlag Chemie, Weinheim
- Jolles, P. (1960) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., MyrbSck, K. (eds.), Vol. 4, pp. 431-445, Academic Press, New York
- Shugar, D. (1952) *Biochim. Biophys. Acta*, 8, 302-309

3.7.8.10 α-ГЛКЖОЗИДАЗА

КФ 3.2.1.20, α-D-глюкозид-глюкогидролаза, мальтаза.

Фермент отщепляет остатки α-D-глюкозы, связанные 1,4-связью, от невозстанавливающего конца молекул сахаров. Анализ основан на расщеплении молекулы мальтозы на две молекулы глюкозы, которые затем определяют с помощью реакции гексокиназы (ГК), сопряженной с реакцией глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (Г6ФДГ):



А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ «-ГЛЮКОЗИДАЗЫ

Необходимые растворы

- 0,1 М ацетат натрия, pH 6,0, содержащий 1,5 мМ ЭДТА (5,7 мл 100%-ной уксусной кислоты, M_T 60, разводят в 800 мл воды, добавляют 560 мг ЭДТА* $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M_m 372,2, доводят до pH 6,0 раствором 1 н. NaOH, доводят объем до 1 л)
0,5 М мальтоза (моногидрат, M_x 360; 18 г в 100 мл воды)

Ход определения

0,74 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 6,0

0,25 мл 0,5 М мальтозы

0,01 мл раствора фермента

Инкубируют 5 мин при 25 °С, а затем останавливают реакцию, перенося реакцию смесь на баню с кипящей водой (100 °С). Для определения глюкозы отбирают аликвоты объемом 0,1 мл.

Концентрация

74 мМ

125 мМ

Б. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ

Необходимые растворы

100 мМ триэтанолламин • HCl/NaOH, pH 7,6 (триэтанолламин-HCl, доводят pH раствором 1 М NaOH)

1,0 М D-глюкоза (M_m 180,2; 18 г в 100 мл)

0,1 М АТФ (двунариевая соль, тригидрат, M_m 605,2; 605 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M_z 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,01 М НАДФ (двунариевая соль, M_m 787,4; 79 мг в 10 мл)

Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа (Г6ФДГ, фирменные препараты имеют активность от 100 до 500 МЕ/мг, необходимо приготовить раствор с активностью около 5 МЕ в 0,1 мл)

Гексокиназа (ГК, около 200 МЕ/мл)

Реакционная смесь	Концентрация
5,8 мл 0,1 мМ триэтанолламин-НСl/NaOH, рН 7,6	58 мМ
0,6 мл 0,1 мМ MgCl ₂	6 мМ
2,0 мл 1,0 М D-глюкозы	200 мМ
1,0 мл 10 мМ НАДФ	1 мМ
0,3 мл 0,1 М АТФ	3 мМ
0,1 мл ГбФДГ	0,5 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл ГК

Следят за повышением поглощения при 340 нм (25 °С); коэффициент поглощения $\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

Расчет

$$\text{Концентрация глюкозы} = \frac{\Delta A \times V \text{ глюкозидазы} \times V \text{ глюкозы}}{\epsilon_{340} \times 1 \times 0,1} = \frac{\Delta A \times 1 \times 1}{6,3}$$

= мкмоль глюкозы в 1 мл инкубационной смеси (за вычетом раствора сравнения); V — объем реакционной смеси, мл.

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, pp. 205-206, Verlag Chemie, Weinheim
- Bruni, C.B., Sica, V., Auricchio, F., Covelli, I. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 212, 470-477
- Dahlquist, A. (1968) *Anal Biochem.* 22, 99-107
- Flanagan, P.R., Forstner, G.G. (1978) *Biochem. J.* 173, 553-563
- Lamer, J. (1960) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 4, pp. 369-378, Academic Press, New York
- Sorensen, S.H., Noren, O., Sjostrom, H., Danielsen, E.M. (1982) *Eur. J. Biochem.* 126, 559-568

3.7.8.11 Р-ГАЛАКТОЗИДАЗА

КФ 3.2.1.23, β -D-галактозид-галактогидролаза, лактаза

лактоза + H₂O \longrightarrow β -D-галактоза + D-глюкоза

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,6

0,05 М о-нитрофенил-Р-О-галактопиранозид (о-НФГ, M_m 301,3; 150 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6)

Р-Галактозидаза из *E. coli* (около 300 МЕ/мг)

Ход определения	Концентрация
0,88 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6	88мМ
0,1 мл 0,05 М о-НФГ	5,0 мМ
Реакцию начинают добавлением 0,02 мл раствора фермента и следят за ростом поглощения при 405 нм (25 °С); $\epsilon_{405} = 3500 \text{ л-моль}^{-1}\text{см}^{-1}$.	

Литература

- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, pp. 197-198, Verlag Chemie, Weinheim
- Graven, R.G., Steers, E., Anfinsen, C.B. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2468-2477
- Rotman, B., Zderic, J.A., Edelman, M. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 1-6
- Woolen, J.W., Turner, P. (1965) *Clin. Chim. Acta* 12, 647-658

3.7.8.12 Р-ФРУКТОЗИДАЗА

КФ 3.2.1.26; Р-D-фруктофуранозид—фруктогидролаза, Р-фруктофуранозидаза, инвертаза, инвертин, сахараза.

Фермент отщепляет конечные невосстанавливающие остатки Р-D-фруктофуранозидов, в частности расщепляет молекулу сахарозы. Этот фермент был одним из наиболее интенсивно изучаемых ферментов на ранних этапах развития биохимии. Именно для реакции инвертазы было впервые выведено уравнение Михаэлиса-Ментен. Анализ ферментативной активности основан на том, что при расщеплении сахарозы до эквимольных количеств глюкозы и фруктозы изменяется (инвертируется) угол поворота плоскости поляризации света. За ходом реакции можно следить с помощью поляриметра (ДОВ-спектрометра). Здесь приведен метод анализа, рассчитанный на 10 мл образца в кювете с длиной оптического пути 10 см; при использовании кювет другого объема следует соответствующим образом изменить количества реагентов.

Необходимые растворы

- 0,05 М ацетатный буфер, рН 4,62 (2,85 мл 100%-ной уксусной кислоты, M_T 60, разводят в 800 мл воды, доводят до рН 4,62 раствором 1 н. NaOH, доводят объем до 1 л)
- 0,3 М Б-(+)-сахароза (M_m 342,3; 10,3 г в 100 мл воды)
- 1 М карбонат натрия (Na_2CO_3 ■ $\text{ЮН}_2\text{O}$, M_2 286,1; 28,6 г в 100 мл воды)

Инвертаза из дрожжей (около 300 МЕ/мг)

Ход определения	Концентрация
1,9 мл 0,05 М ацетатного буфера, рН 4,62	24 мМ
2,0 мл 0,3 М сахарозы	150 мМ
нагревают до 30 °С	

0,1 мл раствора инвертазы инкубируют в течение разных промежутков времени (1-10 мин) и добавляют 6 мл Na_2CO_3 . Измеряют поляризацию света в 10-см ячейке поляриметра. Одна единица ферментативной активности соответствует расщеплению 1 мкмоль субстрата в минуту.

Литература

Myrback, K. (1960) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 4, pp. 379-396, Academic Press, New York
Sumner, J.B., Howell, S.F. (1935) *J. Biol. Chem.* 108, 51-54

3.7.9 Протеазы

Существует множество методов определения активности протеаз. Это связано с большим разнообразием этих ферментов и их специфичностью. Протеазы классифицируют в соответствии с несколькими критериями. По механизму катализа различают три основных типа протеаз: сериновые, цистеиновые и металлопротеиназы. По типу действия на субстрат выделяют экзо- и эндопротеиназы. Третий критерий для классификации — субстратная специфичность, например, существуют трипсиноподобные и химотрипсиноподобные ферменты. Для выбора подходящего типа анализа следует учитывать принадлежность фермента к тому или иному типу. При проведении исследований, особенно в случае нового фермента, необходимо конкретизировать цель эксперимента: либо это анализ свойств высокоспецифичного фермента, либо идентификация полного спектра расщепляемых белков и образующихся продуктов. В первом случае требуются специфические субстраты, а во втором необходимо подобрать методы детекции образующихся продуктов. В настоящем разделе мы сначала остановимся на методах определения общей протеолитической активности, а затем обратимся к анализу специфических протеаз и пептидаз.

Литература

Cunningham, L. (1965) *Comprehensive Biochem.* 16, 85-188

3.7.9.1 МЕТОД АНСОНА

В данном методе анализа в качестве недорогого субстрата используют гемоглобин. Поскольку белки в нативной конформации могут быть устойчивы к действию протеаз, перед проведением анализа гемоглобин подвергают денатурации под действием мочевины. После отделения негидролизованного белка продукты расщепления в супернатанте анализируют с помощью реактива Фолина-Чокалтеу, который наиболее чувствителен к триптофа-

ну и тирозину, но также к цистеину и гистидину. Температура реакционной смеси зависит от свойств конкретного фермента, но обычно колеблется от комнатной (25 °С) до 50 °С для более стабильных ферментов.

Необходимые растворы

1 н. NaOH (M_T 40,0; 4 г NaOH в 100 мл воды, хранят в полиэтиленовой посуде)

0,5 н. NaOH (одна часть 1 н. NaOH на одну часть воды)

1 М KH_2PO_4 (M_m 136,1; 13,6 г в 100 мл воды)

0,3 М трихлоруксусная кислота (M_m 163,4; 4,9 г в 100 мл воды)

Фенольный реактив Фолина-Чокалтеу (фирменный реактив, хранят при 4 °С; перед использованием один объем реактива разбавляют двумя объемами воды)

0,2 М HCl (3,31 мл HCl (37%) доводят до 200 мл водой)

1 мМ L-тирозин (M_m 181; 18,1 мг в 100 мл 0,2 М HCl)

Гемоглобин (субстрат): стакан объемом 100 мл, содержащий

10 мл воды, помещают на водяную баню с температурой 25 °С. Постепенно в стакан добавляют следующие компоненты и растворяют при перемешивании:

11,54 г мочевины

2,4 г 1 н. NaOH

0,635 г лиофилизованного гемоглобина

После встряхивания в течение 45 мин добавляют 3,156 г 1 М KH_2PO_4 . Затем добавляют воду до общего веса 32,6 г и доводят pH до 7,5 раствором 1 М HCl. Раствор хранят на холоду (5 °С) и используют на протяжении двух недель. Для каждой новой порции гемоглобина калибровочную кривую строят заново.

Ход определения	Образец	Раствор сравнения
Раствор фермента	250 мкл	250 мкл
Раствор гемоглобина	250 мкл	—
Инкубируют 15 мин при 25 °С		
0,3 М трихлоруксусная кислота	1000 мкл	1000 мкл
Раствор гемоглобина	—	250 мкл
Центрифугируют 5 мин		
Супернатант	500 мкл	500 мкл
0,5 н. NaOH	1000 мкл	1000 мкл
Реактив Фолина-Чокалтеу (в разведении 1:2)	250 мкл	250 мкл
Определяют разницу поглощения образца и раствора сравнения при 750 нм.		

Построение калибровочной кривой

Калибровочную кривую строят для L-тирозина в концентрации от 0 до 250 нмоль. Различные объемы 1 мМ L-тирозина (примерно 12 образцов) от 0 до 250 мкл (1 мкл ~ 1 нмоль) смешивают с 0,2 М HCl до общего объема 0,5 мл. К каждой пробе добавляют 1 мл 0,5 н. NaOH и 0,250 мл реактива Фолина-Чокалтеу (в разведении 1:2). Определяют разность поглощения образца и раствора сравнения (без тирозина). Нужно получить линейную зависимость поглощения от концентрации тирозина, угол наклона прямой равен изменению поглощения на нмоль тирозина.

Расчет

Поскольку трудно определить молярность продукта, образующегося при разложении гемоглобина, пользуются специальными единицами Ансона (AU): 1 AU соответствует количеству фермента, действие которого приводит к появлению окраски, по интенсивности соответствующей одному миллиэквиваленту тирозина (1 нмоль тирозина ~ 1 мКАУ) в минуту в указанных условиях эксперимента.

Поделив значение поглощения при 750 нм на величину угла наклона калибровочной кривой, получаем количество образующегося продукта, выраженное в наномолях тирозина. Чтобы перейти к единицам мКАУ, полученное значение делят на время инкубации в минутах и умножают на три, поскольку лишь 0,5 мл из реакционной смеси объемом 1,5 мл было взято для цветной реакции, а также умножают на фактор разведения.

Таким образом, активность фермента определяется по формуле

$$\frac{\text{мКАУ}}{\text{мл}} = \frac{A_{750} \times 3 \times \text{коэффициент разведения}}{\text{угол наклона} \times \text{мин}}$$

Для получения общей активности фермента полученное значение умножают на общий объем раствора фермента и делят на количество фермента, взятого для эксперимента, а также на фактор пересчета в AU.

Итак, общая активность фермента:

$$\text{AU} = \frac{A_{750} \times 3 \times \text{коэффициент разведения} \times \text{общий объем фермента (мл)}}{\text{угол наклона} \times \text{мин} \times \text{объем фермента в пробе (мл)} \times 10^6}$$

Литература

- Anson, M.L. (1939) *J. Gen. Physiol.* 22, 79-89
 Kunitz, M. (1939) *J. Gen. Physiol.* 22, 447-450
 Peterson, G.L. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 201-220

3.7.9.2 РАСЩЕПЛЕНИЕ КАЗЕИНА

Под действием протеаз казеин превращается в смесь аминокислот, которые анализируют (при 280 нм) в супернатанте после осаждения нерасщепленного белка трихлоруксусной кислотой. Для количественной оценки используют калибровочную кривую, построенную для тирозина. Метод не очень чувствительный.

Необходимые растворы

0,01 М Трис-НС1, рН 8,0, содержащий 10 мМ СаС1₂ (1,47 г СаС1₂ • 2Н₂О в 1 л)

0,2 н. NaOH (А_Т 40,0; 0,8 г в 100 мл воды)

0,2 М уксусная кислота (М_Т 60,05; 12 г в 1 л)

1,2 М трихлоруксусная кислота (ТХУ, М_г 163,4; 19,6 г в 100 мл воды)

1 мМ L-тирозин (М_Т 181; 18,1 мг в 100 мл 0,2 М НС1)

Казеин (субстрат): 2 г казеина растворяют в 90 мл 0,01 М Трис-НС1, рН 8,0, содержащего 10 мМ СаС1₂, с помощью 0,2 н. NaOH. После этого рН доводят до 8,0 с помощью 0,2 М уксусной кислоты и водой доводят объем раствора до 100 мл. Раствор делят на аликвоты, которые хранят при —20 °С.

Ход определения

0,4 мл раствора казеина нагревают до 35 °С и добавляют к нему 0,2 мл протеазы в 0,01 М растворе Трис-НС1, рН 8,0, содержащем 10 мМ СаС1₂. Смесь инкубируют при 35 °С 10 мин, а затем останавливают реакцию добавлением 1 мл 1,2 М ТХУ. Раствор сравнения подвергают тем же процедурам, за исключением того, что раствор протеазы добавляют к раствору казеина после добавления ТХУ. Образцы центрифугируют 5 мин и определяют поглощение супернатанта при длине волны 275 нм.

Одна единица активности соответствует количеству протеазы, приводящей за 1 мин при 35 °С к такому же значению поглощения, как 1 мкмоль тирозина (по калибровочной кривой). Калибровочную кривую строят в соответствующем диапазоне концентраций тирозина.

Литература

Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310

3.7.9.3 РАСЩЕПЛЕНИЕ АЗОКАЗЕИНА

Чувствительность данного метода значительно превосходит чувствительность метода с использованием казеина. Ковалентно связанные с казеином азогруппы высвобождаются в процессе протеолиза; после этого смесь обрабатывают ТХУ и определяют интенсивность окраски супернатанта.

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 8,0

0,2% азоказеин (сульфаниламид азоказеина) в 0,1 М фосфате калия, pH 8,0

10%-ная трихлоруксусная кислота (ТХУ, масса/объем)

Ход определения

0,5 мл раствора азоказеина

0,2 мл раствора протеазы

Инкубируют при 25 °С 30 мин, а затем останавливают реакцию добавлением 0,2 мл 10%-ной ТХУ. Образцы центрифугируют 5 мин и определяют поглощение супернатанта при длине волны 340 нм.

Одна единица активности соответствует количеству протеазы, приводящей к изменению поглощения на одну единицу за 1 ч.

Литература

- Brock, F.M., Frosberg, C.W., Buchanan-Smith, J.G. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 561-569
- Peek, K., Daniel, R.M., Monk, C., Parker, L., Coolbear, T. (1992) *Ear. J. Biochem.* 207, 1035-1044
- Tomarelli, R.M., Chamey, J., Harding, M.L. (1949) *J. Lab. Clin. Med.* 34, 428-433

3 7.9.4 НИНГИДРИНОВЫЙ МЕТОД

Реакция с нингидрином — это очень чувствительный метод определения концентрации белка и свободных аминокислот. С помощью этого метода также можно следить за протеолитическим расщеплением белков. В качестве субстрата для протеазы используют казеин, как это описано выше. Нерасщепленный белок удаляют с помощью трихлоруксусной кислоты, а аликвоту из супернатанта отбирают для реакции с нингидрином.

Необходимые растворы

0,01 М Трис-НС1, pH 8,0, содержащий 10 мМ CaCl₂ (1,47 г CaCl₂ • 2H₂O в 1 л)

0,2 н. NaOH (M_r 40,0; 0,8 г в 100 мл воды)

0,2 М уксусная кислота (M_m 60,05; 12 г в 1 л)

- 1,2 М трихлоруксусная кислота (ТХУ, M_T 163,4; 19,6 г в 100 мл воды)
- Казеин (субстрат)*'. 2 г казеина растворяют в 90 мл 0,01 М Трис-НС1, рН 8,0, содержащего 10 мМ СаС1₂, с помощью 0,2 н. NaOH. После этого рН доводят до 8,0 с помощью 0,2 М уксусной кислоты и водой доводят объем раствора до 100 мл. Раствор делят на алиquotы, которые хранят при -20 °С.
- 2 М ацетатный буфер, рН 5,4 (270 г ацетата натрия С₂Н₃О₂Na • 3Н₂О, M_T 136,1, растворяют в 200 мл воды, добавляют 50 мл ледяной уксусной кислоты и доводят водой до 1 л)
- 10 мМ KCN (M_m 65,1; 65 мг в 100 мл воды)
- 0,2 мМ KCN в ацетатном буфере (0,2 мл 10 мМ KCN добавляют к 9,8 мл ацетатного буфера; готовят непосредственно перед проведением эксперимента)
- Нингидриновый реагент (2,2-дигидрокси-1,3-индандион, A_r 178,1, фирменный препарат)
- 50%-ный этанол
- Стандартный раствор БСА 40 мкг/мл, готовят 100-кратным разведением запасного раствора, 100 мг в 25 мл
- 10 мМ лейцин (DL-лейцин, M_2 131,2; 131 мг в 100 мл воды)

Гидролиз казеина

0,4 мл раствора казеина нагревают до 35 °С и добавляют к нему 0,2 мл раствора протеазы в 0,01 М Трис-НС1, рН 8,0, содержащем 10 мМ СаС1₂. Смесь инкубируют при 35 °С 10 мин, а затем останавливают реакцию добавлением 1 мл 1,2 М ТХУ. Раствор сравнения подвергают тем же процедурам, за исключением того, что раствор протеазы добавляют к раствору казеина после добавления ТХУ. Образцы центрифугируют 5 мин.

Реакция с нингидрином

0,2 мл супернатанта после осаждения ТХУ

0,1 мл 0,2 мМ KCN в ацетатном буфере

0,1 мл нингидринового реагента

Смесь выдерживают 10 мин на бане с кипящей водой или в нагревателе при 100 °С, а затем помещают на 1 мин в лед и добавляют 0,5 мл 50%-нош этанола. Поглощение образца определяют при длине волны 570 нм, вычитая значение поглощения для раствора сравнения, в котором гидролизат заменен водой.

Калибровочная кривая

Для количественного анализа строят калибровочную кривую, используя 12 разведений 10 мМ раствора лейцина (от 1 до 50 мкл доводят до общего объема 200 мкл).

Литература

Rosen, H. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 10-15

3.7.9.5 ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗА

КФ 3.4.11.1; ЛАП, пептидаза S

Цинксодержащая экзопептидаза, отщепляющая N-концевые аминокислотные остатки пептидов, преимущественно остатки Leu, но также и Pro.

Необходимые растворы

0,5 М Трис-НСl, рН 8,5

0,025 М МпСl₂ (МпСl₂ • 2Н₂О, M_r 161,9; 40,5 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6Н₂О, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,0625 М лейцин (M_m 131,2; 820 мг в 100 мл воды, довести до рН 8,5)

0,125 М лейцинамид (гидрохлорид, M_x 166,7; 2,08 г в 100 мл, доводят до рН 8,5)

Раствор фермента (ЛАП; перед экспериментом около 0,1 мл, что соответствует 0,4 мг, активируют нагреванием при 37 °С в растворе, содержащем 0,05 мл 0,025 М МпСl₂, 0,05 мл 0,5 М Трис-НСl, рН 8,5, и 0,8 мл воды, в течение 2 ч).

Реакционная смесь и ход определения	Концентрация
0,05 мл 0,5 М Трис-НСl, рН 8,5	25 мМ
0,4 мл 0,125 М лейцинамида	50 мМ
0,05 мл 0,1 М MgCl ₂	5,0 мМ
0,4 мл Н ₂ О	
0,1 мл раствора фермента	

Следят за снижением поглощения при 238 нм, 25 °С. В раствор сравнения вместо лейцинамида и воды добавить 0,8 мл 0,0625 М лейцина.

Расчет

Активность фермента рассчитывают, пользуясь калибровочной кривой, построенной для лейцинамида при 238 нм (a_m = поглощение/концентрация лейцинамида):

$$\text{ед./мг} = \frac{A_{238}/\text{мин} \times 1000 \times \text{объем реакционной смеси (мл)}}{a_m \times \text{мг фермента в реакционной смеси}}$$

Литература

Hinunelhoch, R. (1970) *Meth. Enzymol.* 19, 508-513

Delange, J.R., Smith, E.L. (1971) *The Enzymes*, 3rd ed., Boyer, P. D. (ed.), Vol. 3, pp. 81-118, Academic Press, New York
 Mitz, M.A., Schlueter, R.J. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 27, 168-172

3.7.9.6 ХИМОТРИПСИН

КФ 3.4.21.1

Эта протеаза расщепляет пептидные цепи преимущественно за остатками Туг, Тгр, Phe и Leu. Флуоресцентный метод детекции описан в разд. 3.7.8.1, посвященном анализу активности липазы.

А. МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SUPHEPA

Необходимые растворы

0,2 М триэтаноламин-NaOH, pH 7,8 (ТЭА, 37,13 г ТЭА-HCl, 2,2 г хлорида кальция в 800 мл воды, доводят до pH 7,8 с помощью 2 н. NaOH, доводят до объема 1л) = *буфер I*

0,2 М триэтаноламин-NaOH, pH 7,8 (ТЭА, 37,13 г ТЭА-HCl в 800 мл воды, доводят до pH 7,8 с помощью 2 н. NaOH, доводят до объема 1л) = *буфер II*

60 мкМ а-химотрипсин (15,2 мг в 10 мл 1 мМ HCl)

0,1 М α -сукцинил- β -фенилаланин- γ -нитроанилид (SUPHEPA; M_r 385,4; 385 мг в 10 мл *буфера II*)

Реакционная смесь и ход определения

0,95 мл буфера I

0,04 мл 0,1 М SUPHEPA

0,01 мл а-химотрипсина

Следят за ростом поглощения при 405 нм, 25 °С; коэффициент поглощения л-нитроанилида $\epsilon_{405} = 10,2 \cdot 10^3$ л-молы⁻¹см⁻¹.

Концентрация

190 мМ

4,0 мМ

Литература

Beigmeier, H.U. (1984) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 5, pp. 99-104, Verlag Chemie, Weinheim
 Fiedler, F., Geiger, R., Hirschauer, C., Leysath, G. (1978) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 259, 1667-1673
 Nagel, W., Willig, F., Peschke, W., Schmid, F.H. (1965) *Hoppe Sey let's Z. Physiol. Chem.* 340, 1-10

Б. МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ GLUPHEPA

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,6

10 мМ N-глутарил-Г-фенилаланин- γ -нитроанилид (GLUPHEPA; M_m 399,4; 40 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,6)

Реакционная смесь и ход определения
 0,98 мл GLUPHEPA
 0,02 мл раствора фермента
 Следят за ростом поглощения при 405 нм, 25 °С; коэффициент поглощения и-нитроанилида $\epsilon_{405} = 10,2 \cdot 10^3$ л моль⁻¹ см⁻¹.

Концентрация
 10 мМ

Литература

Erlanger, B.F., Cooper, A.G., Bendich, H.J. (1964) *Biochemistry* 3, 1880-1883
 Schwert, G.W., Takenaka, Y. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 16, 570-575

3.7.9.7 ПЕПСИН

КФ 3.4.23.1; пепсин А

Эндопептидаза, содержащаяся в желудочном соке, расщепляет гидрофобные, главным образом ароматические, остатки.

Необходимые растворы

2%-ный гемоглобин (растворяют 2,5 г гемоглобина быка в 100 мл воды, перемешивают 5 мин и фильтруют через стекловолноко; затем к 80 мл фильтрата добавляют 20 мл 0,3 М HCl)
 0,3 М трихлоруксусная кислота (M_r 163,4; 4,9 г в 100 мл воды)
 0,01 М HCl (0,83 мл HCl (37%) в 1 л воды)
 Пепсин (5 г в 10 мл 0,01 М HCl, для измерения разводят в 50 раз 0,01 М HCl)

Ход определения	Образец	Раствор сравнения
2%-ный гемоглобин	0,3 мл	0,3 мл
Инкубируют на водяной бане при 37 °С		
0,3 М трихлоруксусная кислота	—	0,6 мл
Пепсин	0,1 мл	0,1 мл
10 мин при 37 °С		
0,3 М трихлоруксусная кислота	0,6 мл	—
5 мин при 37 °С		
Центрифугируют 5 мин		
Регистрируют поглощение при 280 нм		

Расчет

$$\text{ед./мг} = \frac{(A_{280, \text{ проба}} - A_{280, \text{ раствор сравнения}}) \times 1000}{10 \text{ мин} \times \text{мг фермента в реакционной смеси}}$$

Литература

Bergmeyer, H.U. (1984) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 5, pp. 232-233, Verlag Chemie, Weinheim

- Fruton, J.S. (1971) *The Enzymes*, 3rd ed., Boyer, P. D. (ed.), Vol. 3, pp. 119-164, Academic Press, New York
- Kassel, B., Meitner, P.A. (1970) *Meth. Enzymol.* 19, 337-347

3.7.9.8 ТРИПСИН

КФ 3.4.21.4

Эта протеаза расщепляет пептидные связи преимущественно за остатками Arg и Lys.

Необходимые растворы

0,3 М фосфат калия, pH 8,0

20 мМ К'-бензоил-Ь-аргинин-и-нитроанилид (BAPNA, M_m 434,9; 174 мг в 20 мл ДМСО)

1 мМ трипсин (23,4 мг в 1 мл 1 мМ HCl; непосредственно перед измерением разводят в 50 раз 0,05 М фосфатом калия, pH 8,0)

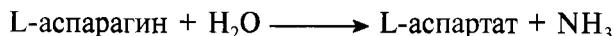
Реакционная смесь и ход определения	Концентрация	
0,7 мл H ₂ O		
0,18 мл 20 мМ BAPNA	3,0 мМ	
0,10 мл 0,3 М фосфата калия, pH 8,0	30 мМ	
0,02 мл раствора трипсина	9 мкг/мл	
Регистрируют поглощение при 405 нм, 25 °С;		ϵ_{405} -
= 9620 л-моль ⁻¹ -см ⁻¹ .		

Литература

- Gaertner, H.F., Puigserver, A.J. (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14, 150-155
- Gravett, P.S., Viljoen, C.C., Oosthuizen, M.M.J. (1991) *Int. J. Biochem.* 23, 1085-1099
- Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310
- Schwert, G.W., Takenaka, Y. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 16, 570-575
- Wachsmuth, E.D., Fritze, I., Pfeleiderer, G. (1966) *Biochemistry* 5, 169-174
- Willstatter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Dunaituria, S., Kiistner, G. (1926) *Z. Physiol. Chem.* 161, 191-209

3.7.9.9 АСПАРАГИНАЗА

КФ 3.5.1.1; L-аспарагин—амидогидролаза



Анализ активности фермента осуществляют путем детекции выделяющегося аммиака с помощью реактива Несслера. Одна

единица ферментативной активности соответствует количеству фермента, приводящего к выделению 1 мкмоль NH_3 в минуту при 37 °С, рН 8,6.

Необходимые растворы

0,05 М Трис-НС1, рН 8,6

0,01 М L-аспарагин (моногидрат аспарагина, M_m 150,1; 150 мг в 100 мл 0,05 М Трис-НС1, рН 8,6)

1,5 М трихлоруксусная кислота (ТХУ, M_x 163,4; 24,5 г в 100 мл воды)

Реактив Нesslerа

Ход определения

0,05 М Трис-НС1, рН 8,6

0,01 М L-аспарагин

1,5 М ТХУ

Фермент

10 мин инкубируют на водяной бане при 37 °С

1,5 М ТХУ

0,05 мл Трис-НС1, рН 8,6

Центрифугируют 5 мин

К 7,0 мл воды добавляют 0,5 мл прозрачного супернатанта и 1,0 мл реактива Нesslerа и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Регистрируют поглощение при 480 нм. Концентрацию аммиака определяют по калибровочной кривой, построенной с помощью сульфата аммония.

Расчет

$$\text{МЕ/мг} = \frac{\text{мкмоль NH}_3}{10 \text{ мин} \times \text{мг фермента в реакционной смеси}}$$

Литература

Mashburn, L.T., Wriston, C.J. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 50-55
 Suit, H.M., Herbut, P.A. (1970) *J. Biol. Chem.* 240, 2234-2242

3.7.9.10 УРЕАЗА

КФ 3.5.1.5, карбамид—амидогидролаза



Молекула фермента содержит никель. Образование аммония можно измерять с помощью рН-стата или спектрофотометра.

используя сопряженную реакцию с глутаматдегидрогеназой (ГлДГ).

А. МЕТОД pH-СТАТИРОВАНИЯ

Необходимые растворы

0,2 М мочевины (M_2 60,0; 1,2 г в 100 мл воды, довести до pH 6,1)

0,1 М HCl, стандартный раствор
Уреаза (1 мг/мл)

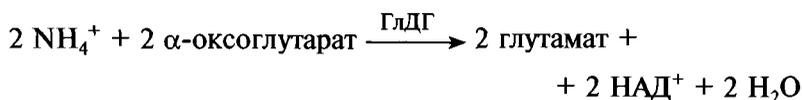
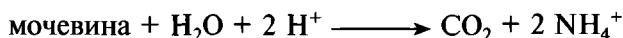
Ход определения

9,0 мл 0,2 М мочевины

0,2 мл уреазы

Автоматическую бюретку заполняют 0,1 М HCl и поддерживают pH на уровне 6,1 с помощью pH-стата. На протяжении 10 мин регистрируют объем титрующего раствора, добавленного автотитратором в единицу времени.

Б. ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД



Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,6

2,0 М мочевины (M_2 60,0; 12 г в 100 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,6)

25 мМ АДФ (двунариевая соль, M_T 471,2; 118 мг в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,6)

10 мМ НАДН (двунариевая соль, M_m 709,4; 71 мг в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,6)

0,1 М α -оксоглутарат (натриевая соль, M_2 168,1; 168 мг в 10 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,6)

Глутаматдегидрогеназа из печени быка (ГлДГ, 500 МЕ/мл в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,6)

Уреаза (около 1 мг/мл, непосредственно перед проведением эксперимента разводят 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,6, до активности 0,1 МЕ/мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,6 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,6	86 мМ
0,3 мл 25 мМ АДФ	0,75 мМ
0,2 мл 10 мМ НАДН	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М α -оксоглутарата	1,0 мМ
0,3 мл 2,0 М мочевины	60 мМ
0,3 мл ГлДГ	15 МЕ/мл

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл уреазы

Следят за снижением поглощения при 340 нм, 25 °С;
 $\epsilon_m = 6,3 \cdot 10^3$ л-мольг⁻¹ см⁻¹.

Литература

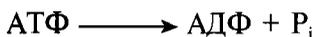
Sumner, J.B. (1926) *J. Biol. Cheml.* 69, 435-441

Sumner, J.B., Hand, D.B. (1928) *J. Biol. Chem.* 76, 149-162

Varner, J.E. (1960) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 4, pp. 247-256, Academic Press, New York

3.7.9.11 АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА

КФ 3.6.1.3; АТФ -аза, АТФ—фосфогидролаза



Многие АТФ-азы в клетке связаны с компонентами мембран, задействованными, например, в системе окислительного фосфорилирования или ионного транспорта. Активность нерастворимой фракции измеряют в гомогенатах клеток или суспензиях мембран.

Необходимые растворы

0,1 М ТЕС-Трис, рН 7,5 (1С-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновая кислота, M_x 229,3; 3,44 г в 100 мл, доводят до рН 7,5 0,2 М трис(гидроксиметил)аминометаном (Трис, 4,84 г в 200 мл) и доводят водой до 200 мл)

0,1 М АТФ (двунариевая соль, тригидрат, M_T 605,2; 605 мг в 10 мл)

0,1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M_m 203,3; 203 мг в 10 мл)

Раствор БСА (100 мг в 100 мл)

10%-ный (масса/объем) додецилсульфат натрия (SDS)

Реакционная смесь	Концентрация
7,5 мл 0,1 М ТЕС-Трис, рН 7,5	75 мМ
1 мл 0,1 М MgCl ₂	10 мМ
0,5 мл 0,10 М АТФ	5 мМ
1 мл БСА	0,1 мг/мл

Ход определения

Аккуратно встряхивая, инкубируют 1 мл реакционной смеси с образцами суспензии мембран (5-20 мкл) при 37 °С. Через определенное время (1, 5, 10 мин — в зависимости от активности фермента) реакцию останавливают добавлением 1 мл раствора SDS. Образующийся неорганический фосфат определяют в соответствии с методом, приведенным в разд. 3.8.2, а активность фермента выражают в микромолях неорганического фосфата, образующегося за 1 мин.

Литература

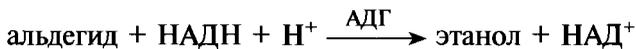
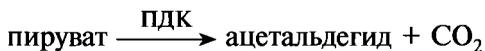
- Gelfand, V.I., Gyoeva, F.K., Rosenblat, V.A., Shanina, N.A. (1978) *FEBS Lett.* 88, 197-200
 Martin, S.S., Senior, A.E. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 602, 401-418

3.7.10 Лиазы

3.7.10.1 ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗА

КФ 4.1.1.1, ПДК, карбокси-лиаза 2-оксокислот

Анализ активности фермента может быть основан на определении концентрации выделяющегося CO₂ манометрическим методом или на определении радиоактивности с использованием меченого ¹⁴C1-пирувата. Здесь приводится метод анализа, основанный на проведении сопряженной реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой (АДГ).

**Необходимые растворы**

- 0,2 М цитратный буфер, рН 6,0
 1 М пируват (пируват натрия, M_m 110,0; 1,1 г в 10 мл воды)
 0,01 М тиаминдифосфат (ТДФ, кокарбоксилаза, M_m 460,8; 46,1 г в 10 мл воды)
 0,1 М MgCl₂ (MgCl₂ • 6H₂O, M_c 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,01 М НАДН (двунариевая соль, M_m 709,4; 71 мг в 10 мл воды)
АДГ из дрожжей (20 мг/мл)

Реакционная смесь	Концентрация
8,9 мл 0,2 М нитратного буфера, pH 6,0	178 мМ
0,3 мл 0,01 М НАДН	0,3 мМ
0,3 мл 1 М пирувата	30 мМ
0,2 мл 0,01 М ТДФ	0,2 мМ
0,1 мл 0,1 М $MgCl_2$	1,0 мМ
0,01 мл АДГ	

Ход определения

0,98 мл реакционной смеси

0,02 мл раствора фермента

Следят за снижением поглощения при 340 нм, 25 °С;

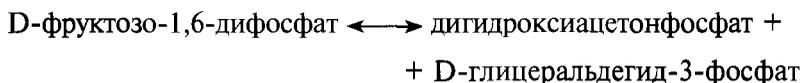
$\epsilon_{340} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ л-моль}^{-1}\text{-см}^{-1}$.

Литература

- Utter, M.F. (1961) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 5, pp. 319-340, Academic Press, New York
Ullrich, J., Wittorf, J.H., Gubler, C.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 113, 595-604
Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, pp. 302-303, Verlag Chemie, Weinheim

3.7.10.2 АЛЬДОЛАЗА

КФ 4.1.2.13; D-фруктозо-1,6-дифосфат D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза, фруктозодифосфатальдолаза



D-Глицеральдегид-3-фосфат вступает в реакцию с гидразином, образуя щразон, который поглощает свет с длиной волны 240 нм.

Необходимые растворы

3,5 мМ гидразинсульфат в растворе 1 мМ ЭДТА, pH 7,5 (растворяют 455 мг гидразинсульфата (M_m 130,1) и 372 мг ЭДТА $\cdot Na_2 \cdot 2H_2O$ (M_r 372,2) в 1 л воды и доводят до pH 7,5 раствором 1 М NaOH)

12 мМ фруктозо-1,6-дифосфат (ФДФ- Ca_3H , M_m 406,1; 487 мг в 100 мл воды, доводят до pH 7,5)

Раствор альдолазы, около 1 МЕ/мл (готовят непосредственно перед проведением эксперимента)

Реакционная смесь	Концентрация
3,0 мл 12 мМ фруктозо-1,6-дифосфата	3,6 мМ
6,0 мл 3,5 мМ гидразинсульфата	2,1 мМ

Ход определения

0,9 мл реакционной смеси

0,1 мл раствора альдолазы

Следят за изменением поглощения при 240 нм, 25 °С, около 10 мин; в раствор сравнения вместо фруктозо-1,6-дифосфата добавляют воду.

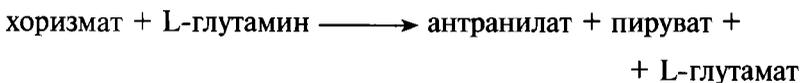
Литература

Jagannathan, V., Sing, K., Damodaran, M. (1956) *Biochem. J.* 63, 94-105

Rutter, J.W. (1962) *The Enzymes*, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (eds.), Vol. 5, pp. 341-366, Academic Press, New York

3.7.10.3 АНТРАНИЛАТСИНТАЗА

КФ 4.1.3.27; хоризмат—пируват-лиаза



Этот важный фермент участвует в биосинтезе ароматических аминокислот, инициируя биосинтез триптофана. Хоризмат — очень нестойкое вещество, которое следует хранить при -70 °С. Процедура выделения хоризмата описана Гибсоном (1964).

Необходимые растворы

50 мМ фосфат калия, рН 7,4

10 мМ хоризмат (соль бария, M_r 361,5; 18,1 мг в 5 мл)

0,2 М L-глутамин (M_m 146,2; 292 мг в 10 мл воды)

0,1 М MgCl_2 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, M_r 203,3; 203 мг в 10 мл)

0,1 М дитиоэритрит (ДТЭ, M_m 154,2; 154 мг в 10 мл)

Реакционная смесь и ход определения	Концентрация
1,7 мл 50 мМ фосфата калия, рН 7,4	42,5 мМ
0,1 мл 0,1 М MgCl_2	5,0 мМ
0,1 мл 0,2 М L-глутамин	10 мМ
0,02 мл 10 мМ хоризмата	0,1 мМ
0,03 мл 0,1 М ДТЭ	1,5 мМ
0,05 мл раствора фермента	

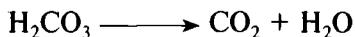
Измеряют флуоресценцию при 37 °С на длине волны 400 нм; длина волны возбуждающего света 325 нм.

Литература

- Crawford, I.P. (1987) *Meth. Enzymol.* 142, 300-307
 Gibson, F. (1964) *Biochem. J.* 90, 256-261
 Goto, Y., Zalkin, H., Keim, P.S., Heinrikson, R.L. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 941-949
 Queener, S.F., Meeks, J.R., Gunsalus, I.C. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 151-161

3.7.10.4 КАРБОАНГИДРАЗА

КФ 4.2.1.1, карбонат—гидро-лиаза, угольная ангидраза



Здесь представлен метод анализа ферментативной активности с использованием рН-метра, но можно также использовать рН-стат.

Необходимые растворы

0,02 М Трис-НС1, рН 8,0

Вода, насыщенная CO₂ (CO₂ пропускают через 200 мл охлажденной во льду воды в течение 30 мин)

Ход определения

Все растворы должны быть охлаждены до температуры 0-4 °С

	Образец	Раствор сравнения
0,02 М Трис-НС1, рН 8,0	6 мл	6 мл
Вода, насыщенная CO ₂	4 мл	4 мл
		измеряют рН и определяют время (t ₀ , необходимое для снижения рН от 8,3 до 6,3
Раствор фермента	0,1 мл	
	измеряют рН и определяют время t, необходимое для снижения рН от 8,3 до 6,3	

Расчет

Активность определяется как $2((t_0 - t)/t_0)$;

$$\text{ед./мг} = \frac{2(t_0 - t)}{t \cdot (\text{мг фермента})}$$

Литература

Murakami, H., Sly, W.S. (1987) / *Biol. Chem.* 262, 1382-1388

Keilin, D., Mann, T. (1939) *Nature* 144, 442^143

3.7.10.5 ФУМАРАЗА

КФ 4.2.1.2, L-малат—гидро-лиаза

L-малат ■*—>- фумарат + H₂O

Необходимые растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

0,05 М L-малат (L-яблочная кислота, *M_T* 134,1; 134 мг в 10 мл
0,1 М фосфата калия, рН 7,5, нейтрализуют 3,5 мл 1 н.

NaOH и доводят до 20 мл 0,1 М фосфатом калия, рН 7,5)

0,1%-ный сывороточный альбумин (мас./об.) в 0,1 М фосфате
калия, рН 7,5

Ход определения

0,98 мл 0,05 М L-малата

0,02 мл раствора фумаразы (разбавленной 0,1%-ным сывороточным альбумином)

Следят за ростом поглощения при 240 нм при 25 °С;
ε₂₄₀ = 2440 л моль⁻¹·см⁻¹.

Литература

Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 2, pp. 189-191,
Verlag Chemie, Weinheim

Hill, R.L., Bradshaw, R.A. (1969) *Meth. Enzymol.* 13, 91-99

Hill, R.L., Teipel, J.W. (1971) *The Enzymes*, 3rd ed., Boyer, P. D. (ed.), Vol. 5, pp. 539 ff,
Academic Press, New York

3.7.11 Изомеразы**3.7.11.1 КСИЛОЗИЗОМЕРАЗА (ГЛЮКОЗИЗОМЕРАЗА)**

КФ 5.3.1.5 D-ксилоза кетол-изомераза

Глюкозоизомераза — один из наиболее широко используемых ферментов. Строго говоря, этот фермент правильнее называть ксилозоизомеразой, а не глюкозоизомеразой. Фермент был выделен из различных микроорганизмов, в которых он участвует в

метаболизме ксилозы. Гемилцеллюлозы ксилан и арабинан — это наиболее распространенные природные питательные вещества, составляющие до 40% всей биомассы на Земле. Эти субстраты расщепляются секретлируемым ферментом экзодействия — ксиланазой, разлагающей полимерные молекулы до мономерных сахаров, таких как ксилоза, которые всасываются обратно в клетку и превращаются в ксилулозу под действием ксилозоизомеразы. После активации ксилулокиназой ксилулоза превращается в О-ксилулозо-5-фосфат и вводится в пентозофосфатный цикл. Благодаря сходству с ксилозой глюкоза также подвергается изомеризации под действием фермента, однако эффективность этого процесса примерно в пять раз ниже (в зависимости от источника фермента). Фермент представляет собой гомотетрамер; молекулярная масса каждой субъединицы составляет около 45 000, а всего белка — порядка 200 000. Каждая субъединица содержит два иона двухвалентного металла, один из которых непосредственно вовлечен в катализ, а другой принимает участие в поддержании нативной конформации. Для изомеризации ксилозы наиболее эффективен ион Mn^{2+} , а для изомеризации глюкозы — ион Co^{2+} . Ионы металлов можно обратимо удалить с помощью ЭДТА, при этом каталитическая активность фермента исчезает. Фермент довольно стабилен, так что даже выделенные из мезофильных источников образцы можно анализировать при 50 °С.

А. Анализ активности D-ксилозоизомеразы

D-ксилоза \longleftrightarrow D-ксилулоза

Необходимые растворы

0,2 М TES-NaOH, pH 8,0 (Ы-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновая кислота, M_m 229,3; 9,2 г в 100 мл, доводят до pH 8,0 раствором 1 М NaOH и доводят водой до 200 мл)

0,4 М D-ксилоза (M_m 150,1; 1,2 г в 20 мл)

0,03 М $MnSO_4$ (моногидрат, M_m 169,0; 57 мг в 10 мл)

1,5%-ный цистеин • HCl (цистеин • HCl моногидрат, M_m 175,6; растворяют 1,5 г в 100 мл воды)

0,12%-ный карбазол (M_m 167,2; 120 мг в 100 мл этанола)

70%-ная серная кислота

Реакционная смесь и ход определения

0,24 мл 0,2 М TES-NaOH, pH 8,0

0,25 мл 0,4 М D-ксилозы

0,01 мл 0,03 М $MnSO_4$

Концентрация

48 мМ

100 мМ

0,3 мМ

Смешивают 20 мкл раствора фермента (или 20 мкл буфера TES в растворе сравнения) и 20 мкл реакционной смеси и инкубируют при определенной температуре (например, при 50 °С) 15 мин в плотно закрытой посуде. Реакцию останавливают, помещая реакционную смесь в лед и добавляя 40 мкл цистеина • HCl и 40 мкл раствора карбазола. После добавления 1,2 мл 70%-ной серной кислоты начинается развитие окраски. Спустя 10 мин инкубации при комнатной температуре измеряют поглощение раствора на фоне раствора сравнения при 546 нм.

Внимание! Окраска изменяется с течением времени, поэтому интервал 10 мин следует выдерживать очень точно и анализировать интенсивность окраски всех образцов через один и тот же промежуток времени. Поглощение раствора сравнения должно составлять около 0,2, если же оно превышает 0,3, растворы всех реагентов следует приготовить заново.

Для проведения количественного анализа используют калибровочную кривую для D-ксилозы в диапазоне от 0 до 10 мкМ.

**Б. Анализ активности D-ксилоизомеразы
НА МИКРОПЛАНШЕТАХ**

Необходимые растворы

0,2 М TES-NaOH, pH 8,0 (Ы-трис(гидроксиметил)метил-2-аминометансульфоновая кислота, M_r 229,3; 9,2 г в 100 мл, доводят до pH 8,0 раствором 1 М NaOH, доводят водой до 200 мл)

0,4 М D-ксилоза (M_r 150,1; 1,2 г в 20 мл)

0,03 М MnSO₄ (моногидрат, M_r 169,0; 57 мг в 10 мл)

Раствор А: 0,05%-ный резорцин (M_r 110,1; 50 мг в 100 мл этанола)

Раствор Б: FeNH₄(SO₄)₂ • 12H₂O (M_r 482,2; 216 мг в 1 л конц. HCl)

Реакционная смесь и ход определения

0,24 мл 0,2 М TES-NaOH, pH 8,0

0,25 мл 0,4 М D-ксилозы

0,01 мл 0,03 М MnSO₄

Концентрация

48 мМ

100 мМ

0,3 мМ

В 96-луночном планшете инкубируют 20 мкл реакционной смеси и 20 мкл раствора фермента (20 мкл буфера TES в растворе сравнения), 15 мин, 50 °С. Затем добавляют 0,15 мл свежеприготовленной смеси растворов А и Б (1:1) и инкубируют 40 мин при 80 °С. Поглощение определяют с помощью ридера при длине волны 630 нм.

В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-ГЛЮКОЗИЗОМЕРАЗЫ**D-глюкоза \longleftrightarrow D-фруктоза****Необходимые растворы**

0,2 М TES-NaOH, pH 8,0 \wedge -трис(гидроксиметил)метил-2-аминометансульфоная кислота, M_m 229,3; 9,2 г в 100 мл, доводят до pH 8,0 раствором 1 М NaOH, доводят водой до 200 мл)

2,0 М D-глюкоза (M_m 180,2; 7,2 г в 20 мл)

0,03 М CoCl₂ (гексагидрат, M_x 237,9; 71 мг в 10 мл)

1,5%-ный цистеин • HCl (моногидрат, M_r 175,6; 1,5 г в 100 мл HCl)

0,12%-ный карбазол (M_m 167,2; 120 мг в 100 мл этанола)

70%-ная серная кислота

Реакционная смесь и ход определения

0,24 мл 0,2 М TES-NaOH, pH 8,0

0,25 мл 2,0 М D-глюкозы

0,01 мл 0,03 М CoCl₂

Концентрация

48 мМ

500 мМ

0,3 мМ

Анализ проводят так же, как описано для ксилозиомеразы (см. пункт А), за исключением того, что после завершения ферментативной реакции и добавления цистеина, карбазола и серной кислоты смесь оставляют стоять 30 мин для развития окраски, а затем измеряют поглощение при длине волны 560 нм. Для построения калибровочной кривой нужно использовать D-фруктозу.

Г. Анализ активности D-глюкозиомеразы

НА МИКРО ПЛАНШЕТАХ

Необходимые растворы

0,2 М TES-NaOH, pH 8,0 \wedge -трис(гидроксиметил)метил-2-аминометансульфоная кислота, M_m 229,3; 9,2 г в 100 мл, доводят до pH 8,0 раствором 1 М NaOH, доводят водой до 200 мл)

2,0 М D-глюкоза (A_r 180,2; 7,2 г в 20 мл)

0,03 М CoCl₂ (гексагидрат, M_z 237,9; 71 мг в 10 мл)

Раствор А: 0,05%-ный резорцин (M_r 110,1; 50 мг в 100 мл этанола)

Раствор Б: FeNH₄(SO₄)₂ • 12H₂O (A_r 482,2; 216 мг в 1л конц. HCl)

Реакционная смесь и ход определения

0,24 мл 0,2 М TES-NaOH, pH 8,0

0,25 мл 2,0 М D-глюкозы

0,01 мл 0,03 М CoCl₂

Концентрация

48 мМ

500 мМ

0,3 мМ

Ход определения такой же, как для ксилозиомеразы, за исключением того, что поглощение измеряют при 490 нм.

Литература

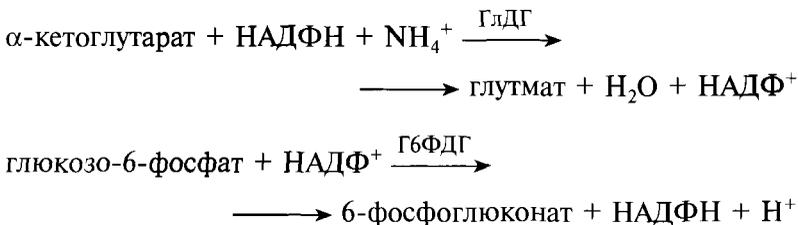
- Dische, Z., Borenfreund, E. (1951) *J. Biol. Chem.* 192, 583-587
 Lechmacher, A., Bisswanger, H. (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 527-536
 Schenk, M., Bisswanger, H. (1998) *Enzyme Microbiol. Techn.* 22, 721-723

3.7.12 Определение концентрации никотинамидных нуклеотидов с помощью сопряженных ферментативных реакций

Никотинамидные нуклеотиды можно определять как субстраты с помощью дегидрогеназ (в частности, ЛДГ или АДГ для определения НАД⁺ и Г6ФДГ для НАДФ⁺), пользуясь соответствующими коэффициентами поглощения (см. разд. 3.5), однако для определения очень низких концентраций этих веществ можно также использовать цикл ферментативных реакций.

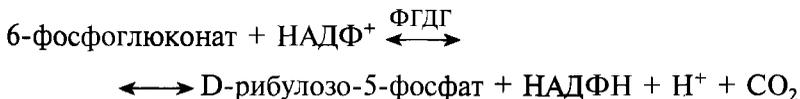
3.7.12.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НАДФ(Н)

Концентрацию НАДФ(Н) можно определять с помощью сопряженных реакций, катализируемых глутаматдегидрогеназой (ГлДГ) и глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназой (Г6ФДГ):



В определенных условиях каждая молекула НАДФ катализирует образование от 5000 до 10 000 молекул 6-фосфоглюконата. Экспериментально можно найти концентрацию НАДФ вплоть до 10⁻⁹ М (10⁻¹⁵ моль в 1 мкл). АДФ выступает в роли активатора ГлДГ.

Количество образовавшегося 6-фосфоглюконата определяют после остановки реакционного цикла по независимой реакции, катализируемой 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.44, ФГДГ, 6-фосфо-Б-глюконат: НАДФ⁺ 2-оксидоредуктаза):



Необходимые растворы

ОД М Трис-НС1, pH 8,0

ОД М ос-кетоглутаровая кислота (натриевая соль, M_m 190,1; 190 мг в 10 мл)

ОД М D-глюкозо-б-фосфат (натриевая соль, моногидрат, M_r 304,1; 304 мг в 10 мл)

0,01 М АДФ (двунариевая соль, M_x 471,2; 47,1 мг в 10 мл)

1,0 М ацетат аммония (M_m 77,1; 771 мг в 10 мл)

БСА (20 мг/мл)

Глутаматдегидрогеназа (ГлДГ, из печени быка, 40 МЕ/мг, готовят раствор 40 МЕ в ОД мл ОД М Трис-НС1, pH 8,0)

Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа (Г6ФДГ, из дрожжей, 300 МЕ/мг, готовят раствор 60 МЕ в ОД мл ОД М Трис-НС1, pH 8,0)

0,01 М 6-фосфоглюконовая кислота (тринатриевая соль, M_z 342,1; 34 мг в 10 мл)

0,01 М НАДФ (M_r 787,4; 79 мг в 10 мл)

ОД М ЭДТА (M_m 292,2; 292 мг в 10 мл)

6-Фосфоглюконатдегидрогеназа (ФГДГ, из дрожжей вида торула, 20 МЕ/мг, готовят раствор ОД МЕ в ОД мл ОД М Трис-НС1, pH 8,0)

Реакционная смесь

1,7 мл ОД М Трис-НС1, pH 8,0

0,10 мл ОД М ос-кетоглутаровой кислоты

0,02 мл ОД М D-глюкозо-б-фосфата

0,02 мл 0,01 М АДФ

0,06 мл 1,0 М ацетата аммония

0,02 мл БСА

0,04 мл ГлДГ

0,04 мл Г6ФДГ

Концентрация

85 мМ

5.0 мМ

1.0 мМ

ОД мМ

30 мМ

0,2 мг/мл

8 МЕ/мл

12 МЕ/мл

Ход определения

ОД мл реакционной смеси

x мкл анализируемого раствора НАДФ или НАДФН (x — в пределах от 1 до 20, конечная концентрация от 3 до $50 \cdot 10^{-9}$ М)

(20 - $jс$) мкл ОД М Трис-НС1, pH 8,0

Инкубируют 30 мин при 37 °С

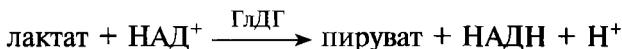
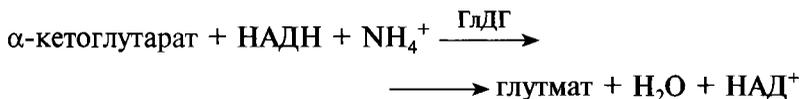
Останавливают реакцию путем переноса образца в кипящую баню (100 °С) на 2 мин.

Флуориметрическое определение	Концентрация
6-фосфоглюконата	
2 мл 0,1 М Трис-НС1, рН 8,0	20 мМ
0,004 мл 10 мМ НАДО	0,02 мМ
0,002 мл 0,1 М ЭДТА	0,1 мМ
0,05 мл образца (6-фосфоглюконата)	
0,02 мл 6-фосфоглюконатдегидрогеназы 0,01 МЕ	

Измеряют флуоресцентное излучение при длине волны 470 нм (возбуждение при 260 нм). Количественное определение проводят, пользуясь калибровочной кривой для 6-фосфоглюконата.

3.7.12.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НАД(Н)

Процедура аналогична той, что описана в разд. 3.7.12.1 для определения НАДФ(Н). Образующийся в глутаматдегидрогеназной реакции НАД⁺ превращается в НАДН под действием ДДГ. Образующийся при этом пируват определяют во второй стадии катализируемого ДДГ процесса, добавляя в систему НАДН.



Избыточный НАДН разлагается в щелочной среде.

Необходимые растворы

0,2 М Трис-НС1, рН 8,4

0,1 М α -кетоглутаровая кислота (двунариевая соль, M_2 190,1; 190 мг в 10 мл)

1 М лактат (натриевая соль, моногидрат, M_T 121,1; 1,1 г в 10 мл)

0,01 М АДФ (двунариевая соль, M_T 471,2; 47,1 мг в 10 мл)

1,0 М ацетат аммония (M_m 77,1; 771 мг в 10 мл)

Глутаматдегидрогеназа (ГлДГ, из печени быка, 40 МЕ/мг, готовят раствор 40 МЕ в 0,1 мл 0,1 М Трис-НС1, рН 8,0)

D-Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, из сердца свиньи, ~550 МЕ/мг, 10 мг/мл, готовят раствор 55 МЕ в 0,1 мл 0,1 М Трис-НС1, рН 8,0)

9 М NaOH (36 г в 100 мл)

0,01 М НАДН (71 мг в 10 мл)

Натрий-калийфосфатный буфер8,97 г NaH_2PO_4 (моногидрат, M_m 138,0)2,61 г K_2HPO_4 (Л/г 174,2)

Растворяют в 100 мл

Раствор 1 (для сопряженных реакций)	Концентрация
1,7 мл 0,2 М Трис-НС1, рН 8,4	85 мМ
0,10 мл 0,1 М α -кетоглутаровой кислоты	5,0 мМ
0,20 мл 1 М лактата	100 мМ
0,06 мл 0,01 М АДФ	0,3 мМ
0,20 мл 1,0 М ацетата аммония	100 мМ
0,04 мл ГЛДГ	8 МЕ/мл
0,04 мл ЛДГ	11 МЕ/мл

Раствор 2

Используют свежеприготовленный раствор:

к 1 мл натрий-калийфосфатного буфера добавляют 20 мкл 10 мМ НАДН и 1,5 мкг ЛДГ из запасного раствора (запасной раствор разводят в 100 раз и отбирают 15 мкл).

Ход определения

0,1 мл реакционной смеси (раствор 1)

x мкл анализируемого раствора НАД или НАДН (л: — в пределах от 1 до 20, конечная концентрация от 3 до $50 \cdot 10^{-9}$ М) (20 - x) мкл 0,2 М Трис-НС1, рН 8,4

Инкубируют 30 мин при 37 °С

Останавливают реакцию путем переноса образца на 2 мин в кипящую баню (100 °С), а затем в ледяную баню.

Добавляют 0,1 мл раствора 2 к каждому образцу.

Инкубируют 15 мин при 25 °С, помещают в ледяную баню и добавляют 25 мкл 5 н. НС1.

Отбирают аликвоты по 0,1 мл и добавляют к 0,2 мл 9 М NaOH.

Инкубируют 10 мин при 60 °С, добавляют 1 мл воды и измеряют флуоресценцию, как описано в разд. 3.7.12.1.

Литература

Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schultz, D.W., Rock, M.K. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2746-2753

3.8 РАЗЛИЧНЫЕ МЕТОДЫ

3.8.1 Определение концентрации белков

3.8.1.1 БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ

Биуретовый реагент взаимодействует с пептидной связью и поэтому является специфическим реагентом для определения концентрации белков и сравнительно нечувствителен к присутствию других веществ. Исключения составляют мочевины, буферы Гуда (буферы на основе цвиттер-ионов) и Трис, которые дают положительную реакцию с биуретовым реагентом. Однако данный метод не очень чувствительный (0,1-0,8 мг) и требует больших затрат белка. Метод удобен для определения концентрации белка в грубом экстракте, а также при крупномасштабных выделениях, однако его не рекомендуется применять для определения концентраций ценных ферментных препаратов. Поскольку при выделении белка следует постоянно пользоваться одним и тем же методом определения концентрации, с самого начала следует решить, использовать ли данный метод или какой-либо другой.

Необходимые растворы

Раствор А (биуретовый реагент)

Последовательно растворяют в 400 мл дистиллированной воды следующие вещества:

9.0 г тартрата натрия-калия ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, M_x 282,2)

3.0 г сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, M_x 249,7)

8.0 г гидроксида натрия ($NaOH$, M_x 40,0)

5.0 г иодида калия (KI , A/g 166,0)

Доводят объем до 500 мл дистиллированной H_2O

Раствор В

3 М трихлоруксусная кислота (ТХУ, $C_2HCl_3O_2$, M_x 163,4; 49 г доводят водой до 100 мл)

Раствор В

20 мг/мл БСА в воде для построения калибровочной кривой.

Растворы А и В хранятся месяцами при комнатной температуре, раствор БСА хранят в замороженном виде при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Ход определения

Различные количества образца белка (0,01-0,1 мл), содержащие от 10 до 50 мг белка/мл, доводят водой до объема 1 мл. В качестве раствора сравнения используют 1 мл воды.

Добавляют 0,15 мл 3 М ТХУ и центрифугируют 3 мин при 5000 об./мин.

Сливают супернатант и растворяют осадок в 1 мл биуретового реагента. Смесь оставляют на 30 мин при комнатной температуре, а затем измеряют поглощение при 546 нм относительно раствора сравнения в кюветах малого объема. Концентрацию белка можно определить по калибровочной кривой, построенной для БСА, в соответствии с уравнением белок (мг/мл) = $A_{546} \times 3,01$ /объем раствора белка (мл)

Литература

- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bucher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., and Pfeleiderer, G. (1953) *Z. Naturforsch.* 8b, 555-577
 Itzhaki, R.F. and Gill, D.M. (1964) *Anal. Biochem.* 9, 401-110

3.8.1.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ БИЦИНХОНИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Метод основан на проведении биуретовой реакции и поэтому также выявляет только наличие пептидных связей. В щелочной среде белок восстанавливает ионы меди Cu^{2+} до Cu^+ , что сопровождается образованием комплекса с двумя молекулами бицинхониновой кислоты (БХК, рис. 3.16), окрашенного в пурпурный цвет. Восстановление ионов меди происходит как под действием пептидных связей, так и под действием окисляемых аминокислотных остатков, таких как остатки тирозина, триптофана и цистеина. Метод значительно более чувствителен, чем биуретовая реакция (< 10 мкг), но также почти нечувствителен к мешающим воздействиям и высоким концентрациям детергентов. Проведению анализа мешают ЭДТА (< 100 мМ), ДТТ (< 1 мМ), Трис (< 0,25 М), сульфат аммония (< 20%) и такие вещества, как глюкоза, которые также способны восстанавливать ионы Cu^{2+} . Осаждение белка (например, ТХУ) не требуется. Метод особенно удобен для определения концентрации иммобилизованных и мембранных белков.

Необходимые растворы

1 мг/мл БСА в воде для построения калибровочной кривой
 1 н. NaOH (М, 40,0, 4 г в 100 мл, хранят в полиэтиленовой емкости)

Раствор А

Последовательно растворяют в 50 мл дистиллированной воды следующие вещества:

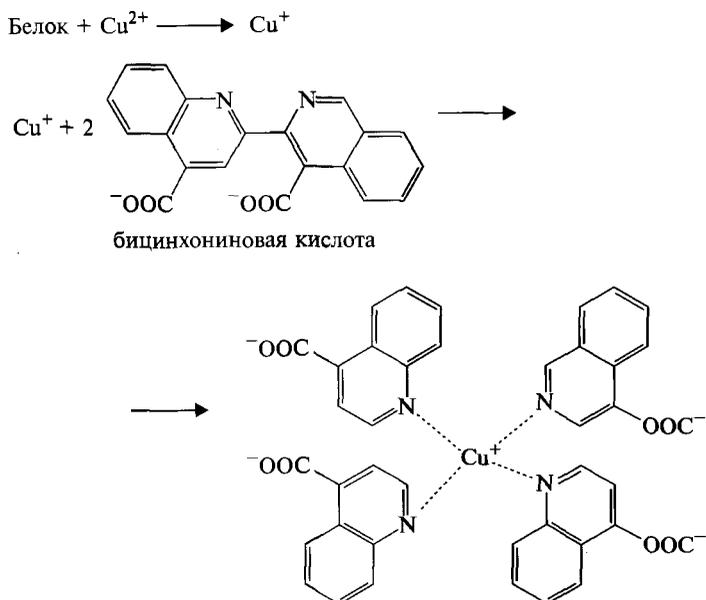


Рис. 3.16. Комплекс Cu^+ с бицинониновой кислотой. (С разрешения Elsevier (Оксфорд) [Smith et al., 1985, Anal. Biochem. 150, 76-85])

1.0 г бицинониновой кислоты (4,4'-дикарбокси-2,2'-бихинолин, двунариевая соль, M_r 388,3)

2.0 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (M_r 124,0)

0,16 г тартрата натрия ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M_x 230,1)

0,4 г NaOH

0,95 г NaHCO_3 (M_z 84,0)

Доводят объем до 100 мл в мерной колбе и устанавливают pH 11,25 с помощью 1 М NaOH или NaHCO_3 .

Раствор Б

1.0 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (M_T 249,7) растворяют в воде, объем доводят водой до 25 мл.

Раствор В

Смешивают растворы А и Б в соотношении 50:1 по объему.

Растворы А и Б хранят при комнатной температуре, раствор В готовят в день проведения анализа.

Ход определения

А. Анализ растворимых белков

50 мкл раствора белка (5-50 мкг белка) или x мкл раствора белка + (50 - x) мкл воды

950 мкл раствора В

Инкубируют 30 мин при 37 °С.

Измеряют поглощение при 562 нм относительно раствора, не содержащего белка.

Калибровочная кривая

Значения для построения кривой получают тем же способом, что и при анализе образцов: 12 образцов, содержащих от 0 до 50 мкл раствора БСА.

Б. Анализ связанных белков

Определенную фракцию матрицы с иммобилизованным белком помещают в 1 мл раствора В и инкубируют 30 мин при 37 °С, слегка помешивая. Перед измерением поглощения матрицу удаляют.

Литература

- Redinbaugh, M.C., Turtley, R.B. (1986) *Anal. Biochem.* 153, 267-271
 Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) *Anal. Biochem.* 150, 76-85

3.8.1.3 МЕТОД ЛОУРИ

Это один из наиболее чувствительных методов определения концентрации белка. Однако правильному определению мешают даже очень низкие концентрации многих веществ, таких как ЭДТА, сахароза, глицин, Трис, детергенты (SDS, Тритон X-100, Lubrol, Brij 35, Chaps), а также неорганические соли (сульфат аммония > 28 мМ, фосфат натрия > 0,1 М, ацетат натрия > 0,2 М). Еще один недостаток метода — ограниченный линейный диапазон зависимости поглощения от концентрации белка. Необходимо быть уверенным, что полученные для неизвестного образца значения находятся внутри линейного диапазона калибровочной кривой, которую обычно строят для БСА.

Необходимые растворы

Раствор А. Карбонатный буфер

Растворяют:

0,4 г тартрата натрия ($C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$, M_2 230,1)

20 г $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ (M_r 124,0)

в 100 мл 1 н. NaOH

Разбавляют водой до 200 мл.

Раствор Б. Щелочной раствор тартрата меди

Растворяют:

2,0 г тартрата натрия-калия ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, M_T 282,2)

1 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (M_T 249,7)

в 90 мл воды и добавляют 10 мл 1 н. NaOH

Раствор В. Разбавленный реактив Фолина-Чокалтеу

1 часть реактива Фолина-Чокалтеу, 15 частей воды

Раствор Г

Раствор БСА 1 мг/мл в воде для построения калибровочной кривой.

Растворы А и Б хранят при комнатной температуре, раствор В готовят в день проведения анализа, раствор БСА хранят в замороженном виде при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Ход определения

Раствор белка должен содержать 4-40 мкг белка; доводят объем раствора водой до 0,3 мл, добавляют 0,3 мл раствора А, инкубируют 10 мин при $50\text{ }^\circ\text{C}$, остужают при комнатной температуре, добавляют 0,33 мкл раствора Б и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Добавляют 1 мл раствора В и немедленно перемешивают, инкубируют 10 мин при $50\text{ }^\circ\text{C}$, остужают при комнатной температуре и измеряют поглощение при 650 нм.

Калибровочная кривая

Значения для построения кривой получают тем же способом, что и при анализе образцов: используют 12 образцов, содержащих от 0 до 40 мкл раствора БСА.

Литература

- Lowry, J.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
Peterson, G.L. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 201-220

**3.8.1.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА
С ПОМОЩЬЮ КУМАССИ (МЕТОД БРЭДФОРД)**

Метод определения белка с помощью красителя Кумасси исходно был предложен для окрашивания белковых полос в геле после электрофоретического разделения. В кислой среде краситель Кумасси G-250 прочно связывается с белками; при этом максимум поглощения сдвигается от 465 к 595 нм. Данный метод прост, быстр и сравнительно малочувствителен к присутствию мешающих агентов (исключение составляют детергенты типа

Тритона X-100 и додецилсульфата натрия). Сила связывания и, следовательно, интенсивность окрашивания зависят от конкретного белка. Поэтому калибровочная кривая, построенная с помощью БСА, позволяет получить лишь ориентировочные данные, а возможные вариации превышают 50%; чувствительность метода составляет 10-100 мкг, однако в миниатюризованном варианте метода удается детектировать всего 2 мкг белка. Недостаток метода — окрашивание кювет в синий цвет, однако можно использовать одноразовые пластиковые кюветы. Стеклокюветы можно отмыть ацетоном или выдержать несколько часов в 0,1 М HCl.

Приготовление раствора Кумасси

Растворяют 100 мг Кумасси бриллиантового синего G-250 в 50 мл этанола и добавляют 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты (88%). Разводят образующийся раствор до конечного объема 1 л.

Фильтруют и хранят при комнатной температуре несколько недель.

Ход определения

Образцы (0-50 мкл), содержащие 0 (раствор сравнения) или 2-40 мкг белка, доводят водой до объема 50 мкл, добавляют 0,95 мл раствора Кумасси и перемешивают. Через 2 мин (но не позднее, чем через 1 ч) определяют поглощение при 595 нм по отношению к раствору сравнения, в котором вместо белка содержится буфер. Содержание белка определяют по калибровочной кривой, построенной для БСА в том же диапазоне концентраций.

Литература

- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
Friedenauer, S., Berlet, H.H. (1989) *Anal. Biochem.* 178, 263-268

3.8.1.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА ПО ПОГЛОЩЕНИЮ РАСТВОРА

Для понимания принципа данного метода анализа важно иметь представление о спектральных свойствах белков и других веществ, особенно нуклеиновых кислот, которые присутствуют в клетке и, следовательно, в грубых клеточных экстрактах. Хотя белки чрезвычайно сильно различаются своими первичными

последовательностями, все они имеют практически идентичные спектры поглощения (см. разд. 4.3.1). В этих спектрах можно различить два характерных пика в УФ-области: пик с большей интенсивностью при 210 нм и пик с меньшей интенсивностью при 280 нм (рис. 3.17). Этот последний пик складывается из пиков поглощения трех ароматических аминокислот — фенилаланина (максимум на длине волны 257 нм), тирозина (274,6 нм) и триптофана (280 нм) (рис. 3.18). Соотношение интенсивностей пиков названных аминокислот следующее: 1 : 7,2 : 28,4; таким образом, максимальный вклад в суммарный пик вносит поглощение триптофана, а вклад фенилаланина можно не учитывать. Понятно, что сказанное выше справедливо только в том случае, если эти аминокислоты в белке присутствуют. Справедливо и обратное утверждение: наличие максимума поглощения при 280 нм является четким указанием на присутствие триптофана в образце.

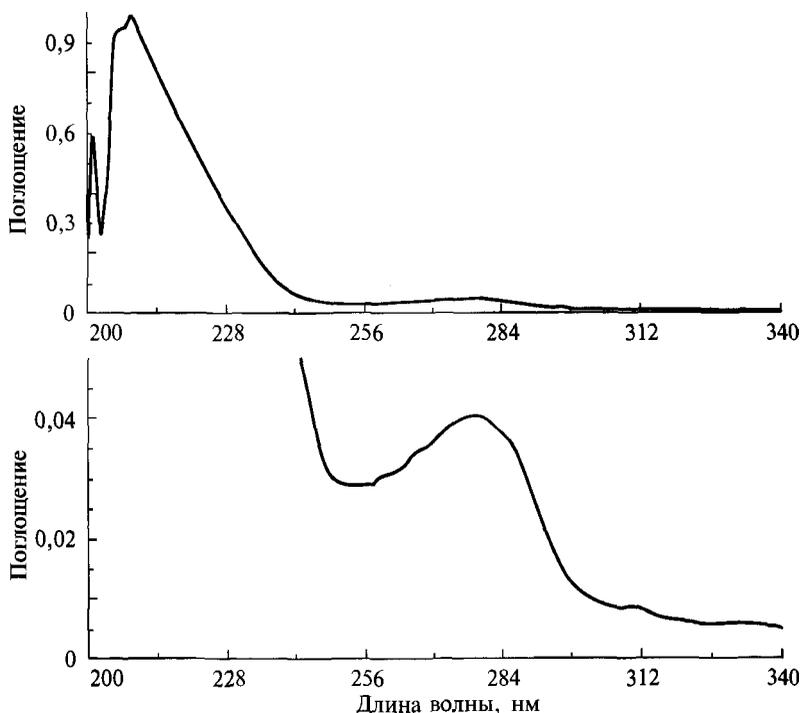


Рис. 3.17. Спектр поглощения бычьего сывороточного альбумина. Нижний спектр получен при большей чувствительности прибора для визуализации пика при 280 нм

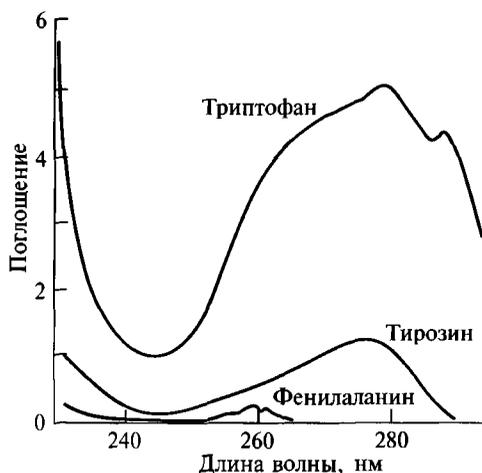


Рис. 3.18. Спектры поглощения трех ароматических аминокислот

Преимущество данного метода анализа состоит в том, что после измерения образец можно использовать вновь. С другой стороны, чувствительность определения невысокая (от 0,05 до 1 мг/мл). Определению мешает присутствие всех веществ, поглощающих в ультрафиолетовом диапазоне. Низкомолекулярные вещества перед проведением анализа можно удалить путем диализа, однако необходимо учитывать присутствие в образце нуклеиновых кислот. Максимум их поглощения приходится на 260 нм, но пик нуклеиновых кислот в значительной степени перекрывает пик белков при 280 нм, поскольку поглощение нуклеиновых кислот гораздо сильнее поглощения белков (рис. 3.19).

Метод Варбурга и Кристиана (табл. 3.4) позволяет определить содержание как белков, так и нуклеиновых кислот, исходя из соотношения поглощений при 280 и 260 нм. Для этого измеряют поглощение раствора образца при двух значениях длин волн по отношению к стандартному раствору и рассчитывают их отношение. Используя коэффициент[^], представленный в табл. 3.4, можно оценить концентрацию белка (рис. 3.20).

Литература

Warburg, O., Christian, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384-421

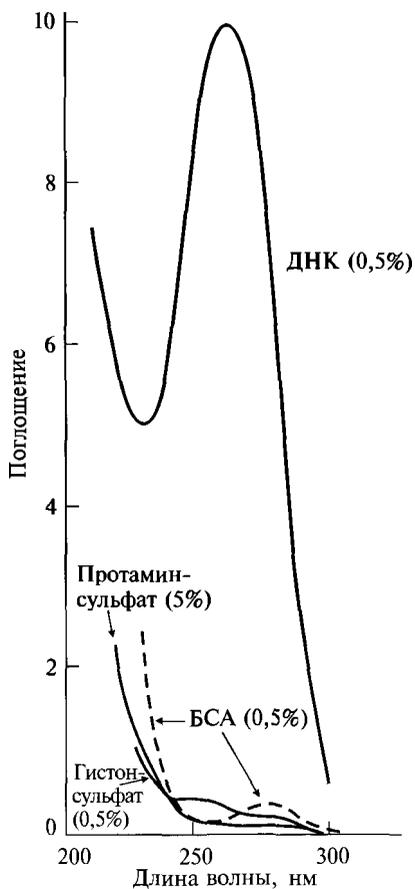


Рис. 3.19. Сравнение спектров поглощения белка и ДНК. Концентрация раствора ДНК — 0,5 мг/мл, такая же концентрация раствора БСА и гистонсульфата, концентрация протаминсульфата — 5 мг/мл. [K.L. Manchester, Biochemical Education 25, 214-215, 1997, с разрешения Американского Биохимического и молекулярно-биологического общества]

3.8.1.6 ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Флуоресцентный анализ обладает очень высокой чувствительностью — позволяет определять до 0,5 мкг белка. Для проведения анализа необходим флуориметр (достаточно фильтрового флуориметра). Чувствительность определения белка в соответствии с приведенной ниже процедурой может быть еще увеличена, если удалять несвязанный краситель методом гель-фильтрации, например, на Сефадексе G-25. Однако это усложняет процедуру, особенно в случае рутинного анализа, и оправдано только в автоматическом режиме.

Таблица 3.4. Определение содержания белка и нуклеиновой кислоты по поглощению в ультрафиолетовой области по Варбургу и Кристиану (1941). Умножая величину поглощения при 280 нм на коэффициент/, определяемый отношением поглощения при 280 и 260 нм, получаем концентрацию белка: $A_{280} \chi_p = \text{мг белка/мл}$

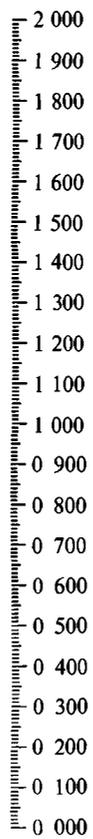
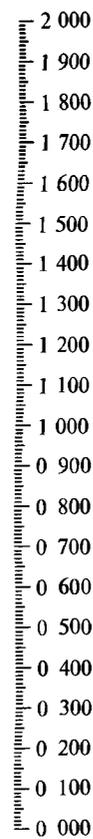
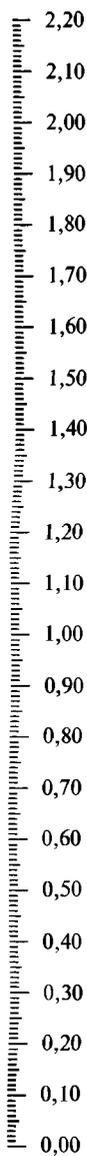
Отношение поглощений 280/260 нм	Нуклеиновая кислота, %	Коэффициент / _p
1,75	0	1,10
1,60	0,25	1,07
1,50	0,50	1,05
1,40	0,75	1,02
1,30	1,00	0,99
1,25	1,25	0,97
1,20	1,50	0,95
1,15	2,00	0,91
1,10	2,50	0,87
1,05	3,00	0,83
1,00	3,50	0,80
0,96	3,75	0,78
0,92	4,25	0,75
0,88	5,00	0,71
0,86	5,25	0,70
0,84	5,50	0,69
0,82	6,00	0,67
0,80	6,50	0,64
0,78	7,25	0,62
0,76	8,00	0,59
0,74	8,75	0,56
0,72	9,50	0,54
0,70	10,75	0,51
0,68	12,00	0,48
0,66	13,50	0,45
0,65	14,50	0,43
0,64	15,25	0,41
0,62	17,50	0,38
0,60 I	20,00	0,35
0,49 I	100,00	

Необходимые растворы

0,05 М фосфат натрия, рН 8,0

Раствор флуорескамина (30 мг в 100 мл диоксана)

Раствор БСА 1 мг/мл для построения калибровочной кривой.

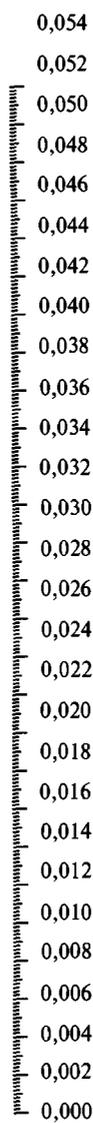


Белок, мг/мл

280 нм

260 нм

Нуклеиновые
кислоты, мг/мл



1 | 3
 c a s g S й
 0,054
 0,052
 я w o 112
 0 s % s
 sia»
 v l f l f
 \$ N S . 8
 " l c f
 S S ' S S
 S X * g g l
 2 и & и
 e i s . s
 ч a S c o
 S f g j s l
 и « a s -
 § * 1 1
 | 2 g - &
 1 1 « 6
 * s 3 я
 | B I I
 H и
 ю s « C J
 5 & 2 с л
 B @ § E
 3 3 * « S
 & S I <
 H G я 2 o
 * e „ B s
 Ш
 S « s s b f c o
 2 « s f c
 с o s o H и н « я
 a « я н « я
 g f . & « S
 | ? B
 5 B я o
 1 ч * s S n
 P > 2 B o «
 § - 8
 £ e y e a f

0
 N
 O
 P
 £

Ход определения

Раствор белка (10-250 мкл) доводят до объема 1,5 мл раствором 0,05 М фосфата натрия, pH 8,0, а затем быстро добавляют 0,5 мл раствора флуорескамина и интенсивно встряхивают. Флуоресценцию измеряют при 475 нм (длина волны возбуждающего света 390 нм). Для количественного определения используют стандартную калибровочную кривую.

Литература

Bohlen, P., Stein, S., Dairman, W., and Udenfriend, S. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 213-220

3.8.1.7 НИНГИДРИНОВЫЙ МЕТОД

Это высокочувствительный метод определения концентрации свободных аминокислот. Он особенно хорошо подходит для определения концентрации иммобилизованных белков, которые можно подвергнуть гидролизу до образования свободных аминокислот.

Необходимые растворы

6 н. HCl (49,7 мл 37%-ной соляной кислоты доводят водой до объема 100 мл)

6 н. NaOH (M_2 40,0; 24 г в 100 мл воды, хранят в полиэтиленовой посуде)

2 М ацетатный буфер, pH 5,4 (270 г ацетата натрия тригидрата ($C_2H_3O_2Na_2 \cdot 3H_2O$, M_m 136,1) растворяют в 200 мл воды, добавляют 50 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем до 1 л)

10 мМ KCN (M_2 65,1; 65 мг в 100 мл воды) Внимание! Чрезвычайно токсичен!

0,2 мМ KCN в ацетатном буфере (0,2 мл 10 мМ KCN + 9,8 мл ацетатного буфера); используют свежеприготовленный раствор Нингидриновый реагент (2,2-дигидрокси-1,3-ищандион, M_m 178,1; фирменный препарат)

50%-ный этанол

Стандартный раствор БСА, 40 мкг/мл, готовят 100-кратным разведением запасного раствора, 100 мг в 25 мл

10 мМ лейцин (DL-лейцин, M_r 131,2; 131 мг в 100 мл воды)

Гидролиз

Определенное количество белка или строго определенный фрагмент носителя с иммобилизованным ферментом инкубируют в течение ночи (16 ч) при 90 °С в 1 мл 6 н. HCl в

герметично закрытых пузырьках, желательнее с плотно завинчивающимися крышками, чтобы избежать вытекания концентрированной кислоты. Затем пузырьки открывают (надеть защитные очки!), отбирают 0,5 мл жидкости и нейтрализуют, добавляя 0,5 мл 6 н. NaOH (контролировать pH).

Ход определения

0,2 мл гидролизата (или аликвота образца, доведенная водой до объема 200 мкл)

0,1 мл 0,2 мМ KCN в ацетатном буфере

0,1 мл нингидринового реагента

Помещают на 10 мин в кипящую водяную баню или нагревательное устройство на 100 °С, охлаждают на льду 1 мин и добавляют 0,5 мл 50%-ного этанола. Поглощение измеряют при 570 нм по отношению к раствору сравнения, в котором вместо гидролизата добавлена вода.

Калибровочная кривая

Для количественного определения используют калибровочную кривую, построенную с помощью 12 аликвот (от 1 до 50 мкл, доводят объем до 200 мкл) 10 мМ раствора лейцина.

Литература

Rosen, H. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 10-15

3.8.1.8 МОДИФИЦИРОВАННЫЙ НИНГИДРИНОВЫЙ МЕТОД БЕЗ ГИДРОЛИЗА ОБРАЗЦА

Данный метод особенно удобен для определения концентрации белка, иммобилизованного на матрице, которая неустойчива в кислой среде. Образцы не должны содержать солей и растворителей, поэтому их предварительно промывают водой и высушивают. Носители, содержащиеся в органическом растворителе, перед проведением анализа промывают дихлорметаном и высушивают.

Необходимые растворы

Амберлит МВ-3

Цианид калия (KCN) Внимание! Чрезвычайно токсичен!

Нингидриновый реагент (2,2-дигидрокси-1,3-индандион,
 M_T 178,1)

Фенол ч.д.а.

Пиридин

Этанол ч.д.а.

0,5 М тетраэтиламмония хлорид (ТЭА хлорид, M_m 165,7; 0,83 г в 10 мл дихлорметана)

БСА, запасной раствор в воде для построения калибровочной кривой, 1 мг/мл

Раствор А

Растворяют

40 г фенола в 10 мл при слабом нагревании и добавляют

4 г Амберлита МВ-3,

встряхивают 45 мин и фильтруют.

Раствор В

Растворяют 65 мг KCN (M_T 65,1) в 100 мл воды;

2 мл этого раствора добавляют к 98 мл пиридина, добавляют

4 г Амберлита МВ-3,

смесь встряхивают и фильтруют.

Раствор В

Смешивают равные части растворов А и Б.

Раствор Г

2,5 г нингидрина растворяют в 50 мл абсолютного этанола.

Хранят в атмосфере азота.

Ход определения

К аликвоте носителя с иммобилизованным ферментом (количество которого составляет 2-5 мг) добавляют 0,2 мл раствора В и 50 мкл раствора Г. В раствор сравнения вносят аликвоту носителя без фермента или вовсе не вносят носитель. Образцы герметично закрывают и прогревают при 100 °С 10 мин. Затем их охлаждают во льду, к каждому образцу добавляют по 1 мл 60%-ного этанола и тщательно перемешивают. Носитель отделяют центрифугированием или фильтрованием. Отделяют супернатант, носитель промывают дважды 0,2 мл 0,5 М хлорида ТЭА и соединяют эту жидкость с супернатантом. Объем всех образцов доводят до 2 мл с помощью 60%-ного этанола и измеряют поглощение при 570 нм относительно раствора сравнения.

Расчет

Строят калибровочную кривую для БСА. Для определения свободных аминокислот можно использовать коэффициент поглощения $\epsilon_{570} = 1,5 \cdot 10^4$ л-моль⁻¹-см⁻¹.

Литература

Sarin, V.K., Kent, S.B. H., Tam, J.P., and Merrifield, R.B. (1981) *Anal. Biochem.* 117, 147-157

3.8.1.9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ 2-НАФТОЛ-1-КАРБОКСИАЛЬДЕГИДА

Определение концентрации белка с помощью данного метода занимает довольно много времени, однако метод применим для иммобилизованных белков. Альдегид образует основание Шиффа с аминогруппами белка. Аминогруппы белка замещаются бензиламином, а концентрацию оснований Шиффа определяют в растворе при 420 нм.

Необходимые растворы

1,2 М 2-нафтол-1-карбоксихальдегид (2-гидрокси-1-нафталальдегид, M_2 172,18, 2,07 г в 10 мл)

Диметилформамид

0,4 М бензиламин (гидрохлорид, M_T 143,6; 0,57 г в 10 мл этанола)

БСА, запасной раствор для построения калибровочной кривой (1 мг/мл в воде)

Этанол ч.д.а.

Ход определения

Образец с иммобилизованным ферментом тщательно промывают диметилформамидом, погружают в 0,5 мл 1,2 М 2-нафтол-1-карбоксихальдегида и встряхивают при комнатной температуре в течение ночи (14 ч). Вынимают носитель и тщательно 5-10 раз промывают диметилформамидом и 5 раз этанолом до тех пор, пока раствор не перестанет поглощать при 280 нм. Добавляют 1 мл 0,4 М бензиламина и встряхивают при комнатной температуре 15 ч. После центрифугирования определяют поглощение супернатанта при 420 нм ($\epsilon_{420} = 1,09 \cdot 10^4$ л моль⁻¹ см⁻¹). Содержание белка рассчитывают по калибровочной кривой, построенной с помощью БСА.

Литература

- Bisswanger, H., Figura, R., Moschel, K., and Nouaimi, M. (2001) *Enzymkinetik, Ligandenbindung und Enzymtechnologie*, 2 edn. Shaker Verlag, Aachen, p. 71
- Общая литература по определению концентрации белка
- Kresse, G.B. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*, Beigmeier, H.U. (ed.), pp. 86-99 Verlag Chemie, Weinheim
- Scopes, R. (1987) *Protein Purification*, Springer, New York
- Stoscheck, C.A. (1990) *Meth. Enzymol.* 182, 50-68
- Thome, C.J.R. (1978) *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry*. Komberg, H.L. (ed.) B104, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-18

3.8.2 Определение концентрации фосфата

Определение концентрации неорганического фосфата требуется в нескольких типах ферментативного анализа, например, при определении активности АТФ-азы (см. разд. 3.7.9.11). Ниже представлен микровариант анализа, позволяющий определять 2-40 мкг неорганического фосфата.

Необходимые растворы

Фосфат натрия, стандартный раствор (растворяют 0,5853 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ в 1 л воды; такой раствор содержит 133,3 мкг фосфора в 1 мл)

12%-ная (мас./об.) трихлоруксусная кислота (ТХУ, 120 г/л)

Юн. $\text{H}_2\text{SО}_4$ (медленно и осторожно добавляют 278 мл концентрированной серной кислоты к 0,7 л воды, надеть защитные очки! После охлаждения доводят объем до 1 л)

10%-ный молибдат аммония (помещают 50 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в химический стакан и при постоянном перемешивании добавляют 400 мл 10 н. $\text{H}_2\text{SО}_4$. После растворения весь раствор переносят в мерную колбу и доводят объем до 500 мл с помощью 10 н. $\text{H}_2\text{SО}_4$. Хранят в темном месте.).

Сульфат железа/молибдат аммония — реagens, приготовленный непосредственно перед использованием: 10 мл 10%-ного раствора молибдата аммония разбавляют водой до 70 мл, добавляют 5 г $\text{FeSО}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, растворяют и доводят объем до 100 мл.

Ход определения

1,8 мл 12%-ной ТХУ

0,1 мл образца

Интенсивно перемешивают и оставляют на 10 мин при комнатной температуре; центрифугируют 10 мин при 1500 об./мин. Отбирают 1,5 мл супернатанта и помещают в кювету, куда также добавляют 1 мл реагента сульфат железа/молибдат аммония. Не позднее, чем через 2 ч, измеряют поглощение раствора при 820 нм. Для определения концентрации фосфата в неизвестном образце используют калибровочную кривую, построенную с помощью стандартных растворов, содержащих от 4 до 20 мкг неорганического фосфата.

Литература

- Chen, P.S., Toribara, T.Y., and Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756-1758
Roufogalis, B.D. (1971) *Anal. Biochem.* 44, 325-328
Tausky, H.H., Shorr, E. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 675-685

3.8.3 Концентрирование растворов ферментов

Повысить концентрацию раствора белка, особенно фермента, иногда бывает непросто. Для каждого конкретного фермента следует подобрать наиболее подходящий способ концентрирования. Часто не удается найти оптимального метода, который позволял бы повысить концентрацию препарата без значительных потерь активности. Существует множество методов концентрирования, однако универсального мягкого метода не существует. Чаще всего методы концентрирования основаны на осаждении, ультрафильтрации, ультрацентрифугировании или лиофилизации. Кроме того, существует несколько методов, основанных на других принципах. Ниже обсуждаются преимущества и недостатки каждого метода, однако общих рекомендаций по данному вопросу дать невозможно.

3.8.3.1 ПРЕЦИПИТАЦИЯ

Преципитация (осаждение) — это старейший метод концентрирования ферментов, который, однако, широко используется и теперь, поскольку при осаждении происходит одновременно и концентрирование, и очистка образца. Серьезный недостаток метода состоит в том, что при осаждении могут происходить структурные изменения образца, которые не всегда обратимы даже после удаления осаждающего вещества. Тем не менее, иногда даже такие сложные системы, как полиферментные комплексы, удается сконцентрировать таким способом без значительных потерь активности. Если образец не претерпевает никаких изменений при осаждении, метод можно использовать для концентрирования. Ранее применялось несколько вариантов данного метода (особенно для очистки образца), поскольку еще не существовало гораздо более мягкого и точного метода разделения — высокоэффективной хроматографии. Для очистки и концентрирования ферментных препаратов применяли осаждение органическими растворителями (в частности, ацетоном и этиловым спиртом), снижение рН или повышение температуры. Теперь эти методы не рекомендуется использовать, поскольку при их проведении часто происходит денатурация фермента. Исключение составляет осаждение белка при значении рН, соответствующем его изоэлектрической точке, когда каждый белок имеет минимальную растворимость в воде. Хлорная и трихлоруксусная кислоты обычно вызывают необратимую денатурацию белка и более пригодны

для удаления белка из раствора, например, с целью определения его концентрации.

Напротив, осаждение с помощью хаотропных агентов до сих пор применяется довольно часто. Используют мочевины (в концентрации 6–8 М) и гуанидинхлорид (его концентрация для достижения такого же эффекта может быть несколько ниже — от 4 до 6 М), особенно для диссоциации белковых агрегатов и разделения субъединиц в более или менее «нативных» условиях (по сравнению, например, с действием додецилсульфата натрия). Для концентрирования ферментов иногда применяют хлорид магния в высокой концентрации, однако классическими реагентами для осаждения ферментов являются сульфат аммония и полиэтиленгликоль. Эти вещества дестабилизируют водородные связи и разрушают гидратную оболочку вокруг поверхности белковой молекулы, что приводит к агрегации белков и их выпадению в осадок. Принято считать, что удаление данных реагентов позволяет полностью восстановить нативную структуру белка.

Преимущество осаждения сульфатом аммония или полиэтиленгликолем состоит в том, что каждый белок осаждается при характерной концентрации реагента, что позволяет отделить искомым белок от других. Для каждого конкретного белка следует экспериментальным путем установить тот диапазон концентраций реагента, при котором он осаждается. Обычно при использовании сульфата аммония осаждение белков происходит в диапазоне от 20 до 100% насыщения, а в случае полиэтиленгликоля достаточно бывает 0–15% насыщения (мас./об.).

При осаждении с помощью сульфата аммония придерживаются одного из двух возможных приемов — либо в раствор образца всыпают сухой реагент, либо добавляют насыщенный раствор. Первый подход проще и, кроме того, еще одно его преимущество заключается в том, что конечный объем смеси не слишком увеличивается. Напротив, при втором подходе, особенно при необходимости создания достаточно насыщенного раствора, конечный объем смеси может оказаться очень большим, а 100%-ное насыщение вообще недостижимо. Несмотря на эти недостатки, во втором варианте осаждения сохраняются более мягкие условия. При растворении кристаллов сульфата аммония выделяются пузырьки воздуха, которые ранее были заключены в кристаллы. Высокое поверхностное натяжение этих пузырьков воздуха губительно для белков. Кроме того, в непосредственной близости от места растворения кристаллов постоянно создается высокая

концентрация соли, что вызывает локальное осаждение белков, хотя в толще раствора еще не достигнут тот уровень соли, при котором осаждается искомый белок. В результате белок подвергается многократному осаждению и растворению, что неблагоприятно для особенно чувствительных ферментов. Для снижения негативного влияния растворения соли рекомендуется добавлять в раствор образца рассчитанное количество сульфата аммония очень медленно, примерно на протяжении 1 ч. Для медленного добавления солей существует несколько специальных устройств (Weisenherz et al., 1953). Если использовать насыщенный раствор сульфата аммония и интенсивное перемешивание, подобных проблем можно избежать. На растворимость как белка, так и соли большое влияние оказывает температура, так что перед проведением эксперимента следует принять решение, осуществлять ли осаждение при комнатной температуре или на холоду (4 °C). Если осаждение необходимо лишь для концентрирования белка, можно всыпать в раствор образца избыток соли и отделить осадок центрифугированием. Если же одновременно ставится задача провести очистку белка, следует строго соблюдать выбранный диапазон концентраций осаждающего вещества. При этом сначала добавляют такое количество соли, чтобы достичь нижней границы диапазона, когда искомый белок все еще находится в растворе, а некоторые балластные белки уже выпадают в осадок и удаляются центрифугированием. Затем сульфат аммония добавляют в таком количестве, чтобы достичь верхней границы диапазона, когда весь искомый белок выпадает в осадок, а некоторые примесные белки остаются в растворе. Для расчета количества сульфата аммония (г), необходимого для создания желаемой степени насыщения (S2) при 0 °C, пользуются формулой

$$S2 = \frac{(S2 - S1) \times 515}{100 - 0,27 \times S2} \times V,$$

где S1 — начальная степень насыщения, а V — объем (мл) раствора белка. Существуют таблицы, позволяющие определить необходимое количество твердого сульфата аммония или его насыщенного раствора (Green and Hughes, 1955; Brewer et al., 1974; табл. 3.5). После осаждения осадок отделяют центрифугированием и перерастворяют в подходящем буфере. Белок следует растворять в минимальном объеме буфера, прекращая добавление буфера в тот момент, когда растворятся последние следы осадка. Чтобы избежать добавления лишнего буфера, можно пользоваться специальными устройствами типа стеклянного или пластикового

стакана с пестиком, в котором осадок тщательно перемешивают с небольшим объемом буфера (Weisenherz et al., 1953). Поскольку в растворе белка остается достаточно большое количество сульфата аммония, после осаждения рекомендуется провести диализ.

3.8.3.2 УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ И ДИАЛИЗ

Ультрафильтрацию чаще других методов применяют для концентрирования растворов белков. Метод прост в исполнении и не вызывает конформационных изменений белка или увеличения концентрации соли. В процессе ультрафильтрации низкомолекулярные вещества, такие как ионы буфера, не задерживаются мембраной, а частично удаляются, и поэтому данный метод может быть использован также для смены буферной системы. Однако серьезным недостатком метода является то, что концентрированный белок имеет тенденцию налипать на поверхность мембраны, что, с одной стороны, мешает прохождению через мембрану жидкости, а с другой стороны, способствует агрегации белка. При этом в худшем случае белок после снятия с мембраны не удастся полностью растворить, поэтому возможны значительные потери белка или ферментативной активности. Частично исправить ситуацию помогает обработка мембраны детергентом типа Тритона X-100.

Для ультрафильтрации существует несколько типов мембран и несколько экспериментальных протоколов. Мембраны изготавливают из целлюлозы (как и диализные мембраны), нитроцеллюлозы и некоторых синтетических полимеров. Мембраны для концентрирования белка должны обладать гидрофобной поверхностью. Мембраны различаются также размером пор, например, существуют мембраны, которые пропускают вещества размером до 3, 10, 30 или 100 кДа. Однако, в отличие от ячеек сита, имеющих абсолютно идентичные размеры, поры мембран для ультрафильтрации могут слегка различаться, так что указанные пределы удерживания являются лишь ориентировочными.

Чтобы избежать налипания белка на мембрану, раствор над поверхностью мембраны необходимо постоянно перемешивать, однако мешалка ни в коем случае не должна касаться хрупкой мембраны. Поэтому магнитную мешалку закрепляют на вертикальной оси в верхней части ячейки для ультрафильтрации, что предотвращает возможность ее контакта с мембраной. Выпускаются ячейки различного размера. Для продавливания раствора

через мембрану используют сжатый воздух или, что лучше, сжатый азот, а прошедший сквозь мембрану раствор собирают. Упомянувшееся выше налипание белка на мембране может постепенно снижать скорость прохождения жидкости. Увеличение давления газа также способствует забиванию пор мембраны, так что для продолжения ультрафильтрации иногда приходится менять мембрану. В ячейках, действующих по принципу тангенциального потока, раствор не перемешивают, а пропускают через мембрану в циклическом режиме.

Для ультрафильтрации разработано несколько специальных устройств. Вместо продавливания раствора сквозь мембрану под действием сжатого воздуха иногда используют центрифугирование или вакуум. Кроме того, раствор можно продавливать сквозь мембрану вручную с помощью шприца, на конце которого закрепляется фильтрующее устройство.

Диализ можно рассматривать в качестве особого варианта ультрафильтрации, при котором раствор белка помещают в диализный мешок, герметично закрывают и погружают во внешний раствор; в процессе диализа содержание низкомолекулярных компонентов в обоих растворах становится одинаковым. Метод обычно используют для удаления нежелательных примесей низкомолекулярных веществ, например, из грубых экстрактов, после градиентного разделения или осаждения с помощью сульфата аммония. Для полного удаления низкомолекулярной примеси объем внешнего раствора должен во много раз превосходить объем образца в диализном мешке; в другом варианте внешний раствор можно периодически заменять на новый.

Диализ также можно использовать для концентрирования белка. С этой целью заполненный раствором белка диализный мешок помещают не во внешний раствор, а полностью покрывают гигроскопичным порошком, который отсасывает из мешка воду и низкомолекулярные вещества, что приводит к концентрированию образца. В качестве таких гигроскопичных сред используют высокомолекулярные вещества типа полиэтиленгликоля или сухого Сефадекса G-25. Для выполнения данной процедуры не требуется никакого специального оборудования, однако возможны значительные потери белка и ферментативной активности в результате взаимодействия белка с большой поверхностью диализного мешка. Предотвратить налипание белка на стенки мешка очень сложно, поскольку внешняя поверхность мешка покрыта гигроскопичным порошком.

3.8.33 УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Ультрацентрифугирование используют для выделения белков с большой молекулярной массой, таких как полиферментные комплексы, которые осаждаются при центрифугировании на высоких скоростях за относительно короткий промежуток времени (который зависит от размера белка, радиуса ротора и скорости вращения); для осаждения большинства более мелких белков требуется слишком длительное центрифугирование. Для реализации данного метода не нужны специальные устройства, однако концентрированный белок образует на дне пробирки плотный осадок, который может оказаться нерастворимым. Для предотвращения подобной ситуации на дно пробирки помещают слой 30%-ного раствора сахарозы. Ультрацентрифугирование также используют для отделения белков от других компонентов с меньшей молекулярной массой.

3.8.34 ЛИОФИЛИЗАЦИЯ

В отличие от обсуждавшихся выше методов получения концентрированных растворов белка, лиофилизация предназначена для получения сухих препаратов, что очень удобно для хранения белков и ферментов. Однако для успешного проведения данной процедуры без значительных потерь активности следует учесть некоторые обстоятельства.

В отличие от ультрафильтрации и ультрацентрифугирования, при лиофилизации удаляется только растворитель, а все другие компоненты раствора концентрируются вместе с белком. В случае очищенного препарата белка это могут быть компоненты буфера, а многие ферменты не выдерживают присутствия высокой концентрации солей. Кроме того, при концентрировании буфера может измениться рН среды. Поэтому для лиофилизации следует использовать летучие буферы, содержащие ацетат, карбонат, триэтиламин или триэтанолламин. Для предотвращения денатурации белка в раствор перед лиофилизацией добавляют глицерин или БСА. Порошок белка очень легкий и разлетается при малейшем движении воздуха. Для высушивания малых объемов образцов преимущество имеют высокоскоростные вакуумные центрифуги, однако в этом случае часто приходится решать проблему охлаждения образца.

В некоторых лабораториях для концентрирования растворов белка применяют роторный испаритель, однако этот метод имеет

тот недостаток, что для испарения жидкости применяется высокая температура, а образующиеся пузырьки воздуха обладают высоким поверхностным натяжением, что оказывает негативное влияние на состояние белкового препарата.

3.8.3.5 НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ МЕТОДЫ

Кристаллизацию можно рассматривать в качестве одного из лучших методов концентрирования, хотя он не является классическим, поскольку лишь немногие ферменты, включая каталазу и уреазу, имеют тенденцию образовывать кристаллы. Кристаллизацию также используют для повышения чистоты препарата белка, хотя для получения кристаллов нужен довольно чистый белок. Кристаллы — это оптимальная форма хранения белка. Для получения кристаллов с целью проведения рентгеновской кристаллографии разработано несколько довольно сложных специфических методов, однако для обычной кристаллизации такие усилия излишни. В отличие от других химических веществ, белки не способны просто образовывать кристаллы в насыщенном растворе; для инициации образования кристаллов требуется добавление хаотропного агента, обычно сульфата аммония. Концентрация такого агента должна быть чуть ниже того уровня, при котором данный белок выпадает в осадок; белок при этом должен находиться в растворе в высокой концентрации — не ниже 10 мг/мл. Если оставить такой раствор на холоду на несколько дней, могут начать образовываться кристаллы. За это время также может происходить очень слабое испарение растворителя, в результате чего концентрация затравки постепенно возрастает. Если кристаллизация прошла успешно, кристаллы следует хранить в том же растворителе и с той же затравкой. Если ее удалить, кристаллы перейдут в раствор.

В результате проведения колоночной хроматографии обычно получают более разбавленные растворы белка. Однако с помощью ионообменной хроматографии или хроматографии на гидроксилapatите можно достичь некоторой степени концентрирования, в частности при выделении белка из очень больших объемов сильно разбавленных растворов. Например, описан метод концентрирования белка на колонке с аминогексил-Сефарозой, которая в таком случае выступает в роли слабого ионообменника (Schmincke-Ott and Bisswanger, 1980). Для достижения достаточной степени концентрирования (до 5 мг белка/мл) важно, чтобы слой носителя был небольшим, так что он фактически перетру-

жен белком. Большинство белков и ферментов связываются с носителями при низкой концентрации буфера (10 мМ фосфат калия, pH 7,6), а снять их с колонки нужно в одну стадию, просто повысив ионную силу раствора (0,1 М фосфат калия, pH 7,6). Наиболее концентрированный раствор белка сходит с колонки практически сразу после смены буфера и его собирают в единую фракцию. Для такого способа концентрирования необходимо провести некоторую предварительную работу, чтобы определить оптимальные условия связывания и элюирования, однако метод позволяет получать высокий (а иногда и количественный) выход в расчете как на количество белка, так и на ферментативную активность. Следовательно, данный метод можно порекомендовать для тех случаев, когда однотипные процедуры выполняют приблизительно в одинаковых условиях.

Литература

- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bucher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., and Pfeleiderer, G. (1953) *Zeitschrift für Naturforschung* 8b, 555-577
- Green, A.A. and Hughes, W.L. (1955) *Meth. Enzymol.* 1, 67-90
- Brewer, J.M., Pesce, A.J., and Ashworth, R.B. (1974) *Experimental Techniques in Biochemistry*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ
- Cooper, T.C. (1977) *The Tools of Biochemistry*, Wiley and Sons, New York
- Schmincke-Ott, E. and Bisswanger, H. (1980) *Prep. Biochem.* 10, 69-75
- Harris, E.L.V. and Angal, S. (1989) *Protein Purification Methods*. IRL Press, Oxford
- Scopes, R.K. (1993) *Protein Purification, Principles and Practice*, 3rd edn. Springer Verlag, New York

3.9 ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Радиоиммуноанализ (РИА) — это метод определения концентрации анализируемого вещества в условиях конкуренции меченого (^{131}I) и немеченого антигена за связывание с антителом; метод предполагает проведение стадии разделения связанных и свободных меченых антигенов. Метод РИА отличается очень высокой чувствительностью, однако работа с радиоактивной меткой требует соблюдения необходимых мер безопасности и наличия соответствующих инструментов. В альтернативном варианте метода применяются также очень чувствительные хемилюминесцентные или флуоресцентные способы детекции. По чувствительности с РИА можно сравнить иммуноферментный анализ (ИФА), который проще в исполнении; в частности, следует назвать метод твердофазного иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunoadsorbent assays, ELISA). Для проведения ИФА требуется только то оборудование, которое практически всегда имеется в лаборатории, а именно фотометр, работающий

в ультрафиолетовой и видимой части спектра, а также центрифуга. Анализ основан на взаимодействии антитела с антигеном и использует высокую каталитическую эффективность ферментов, служащих в качестве метки. В твердофазном варианте анализа одно из взаимодействующих веществ — антиген или антитело — иммобилизуют на твердой подложке. На следующем этапе иммобилизованные молекулы связывают и выводят из раствора комплементарные молекулы. Существуют две стратегии проведения эксперимента — усиление активности и изменение активности. В первом случае антитела присутствуют в большом избытке, что позволяет получить максимально возможный сигнал анализируемого вещества. При этом количество связанного с антителами антигена пропорционально концентрации антигена. Во втором случае наблюдают за изменением сигнала ферментативной метки в результате конкуренции анализируемой молекулы за связывание с той же комплементарной молекулой. В таком варианте достигается более высокая чувствительность анализа при низких концентрациях реагирующих веществ; второй вариант анализа более специфичен, чем первый.

Чувствительность метода определяется по кривой доза-ответ (dI/dC), описывающей изменения ответа (dI) при соответствующем изменении концентрации реагирующего вещества (dC). Такая зависимость должна иметь вид прямой линии, а ее угол наклона как раз и отражает чувствительность метода — чем больше угол наклона, тем более чувствительна система к изменениям концентрации реагирующих веществ. Небольшие концентрации вещества легче определять по графикам, имеющим более пологий вид.

3.9.1 Неконкурентный твердофазный иммуоферментный анализ

На твердой подложке иммобилизуют либо антиген, либо антитело. Эти иммобилизованные молекулы захватывают из раствора образца соответствующие комплементарные молекулы — антиген или антитело. Образующиеся комплексы образуют на подложке следующий слой. Количественное определение связывания молекул из раствора осуществляют несколькими способами. Если свободная молекула — это антитело, можно использовать вторичные антитела против этих (первичных) антител. Например, если первичным антителом является мышинный IgG, в качестве вторичных антител могут служить антитела против IgG мыши, полу-

ченые в другом животном, например в козе. Вторичные антитела должны обладать специфичностью по отношению к мышинным IgG и не должны связываться с антигеном, иммобилизованным на подложке. Вторичные антитела метят ферментативной меткой, активность которой и измеряют. Кроме того, для определения антител, образовавших комплекс с иммобилизованными антигенами, можно использовать неиммунную систему распознавания, например, систему биотин — авидин или белок А — полипептид из *Staphylococcus aureus*, который связывается с Fc-областью молекулы иммуноглобулина.

В альтернативном варианте метода на твердой подложке сначала иммобилизуют антитела, с которыми затем связываются антигены из раствора. На второй стадии с этими антигенами опять связываются антитела (образуется так называемый сэндвич), а на третьей стадии с этими антителами связываются вторичные антитела из другого организма.

Существует гомогенный вариант неконкурентного иммуоферментного анализа. В этом случае два типа моноклональных антител взаимодействуют с разными эпитопами одного антигена. Каждый тип антител метят особой меткой, причем эти метки подбирают таким образом, чтобы продукт первой ферментативной реакции (например, пероксид водорода, образующийся в реакции глюкозооксидазы) служил субстратом второй ферментативной реакции (например, пероксидазной) и чтобы продукт второй ферментативной реакции образовывался в значительном количестве только при условии непосредственного контакта двух ферментов, возникающего при связывании молекул антител с одной и той же молекулой антигена.

3.9.2 Конкурентный твердофазный иммуоферментный анализ

Антитела иммобилизуют на твердой подложке, а затем с ними связываются меченные ферментативной меткой антигены из раствора. На следующей стадии добавляют анализируемый раствор немеченого антигена, молекулы которого начинают конкурировать за антитела с уже связавшимися мечеными молекулами антигена. После установления равновесия вытесненный меченый антиген отмывают и измеряют остаточную ферментативную активность на подложке. По снижению ферментативной активности определяют количество антигена в образце.

В альтернативном варианте на подложке иммобилизуют антиген, с которым связывается свободное меченое антитело из раствора. Свободные немеченые антитела из анализируемого раствора конкурируют за связывание с антигеном с мечеными антителами, в результате чего снижается общая ферментативная активность метки на подложке.

3.9.3 Методы иммуноферментного анализа и способы иммобилизации

3.9.3.1 СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ С АГАРОЗОЙ, АКТИВИРОВАННОЙ БРОМЦИАНОМ

Это очень удобный метод иммобилизации белков и ферментов (пероксидазы, антител и др.) на агарозе или декстранах, например Сефарозе или Сефадексе. Серьезный недостаток метода — высокая токсичность бромциана, в связи с чем очень рекомендуется использовать готовые фирменные носители (например, CNBr-activated Sepharose^R). Активация происходит в сильнощелочной среде, при которой может изменяться структура геля, так что всю процедуру следует осуществлять быстро.

Необходимые реагенты и растворы

Суспензия Сефарозы 4В, 6,6 г в 20 мл воды

3 М NaOH (M_m 40,0; 12 г в 100 мл)

Бромциан (CNBr, M_m 105,9)

0,1 М NaHCO₃ (M_r 84,0; 0,84 г в 100 мл), pH 8,2, содержащий

0,5 М NaCl (M_r 58,4; 2,92 г в 100 мл)

1 М глицин (M_m 75,1; 1,5 г в 20 мл воды)

0,1 М ацетат натрия/уксусная кислота, pH 4,0

0,1 М фосфат калия, pH 7,6

Приготовление активированной Сефарозы 4В

Описанную ниже процедуру следует выполнять под тягой с величайшей осторожностью. С помощью pH-метра и pH электрода значение pH суспензии Сефарозы доводят до 11,2, добавляя 3 М NaOH. На весы устанавливают пустую колбу и взвешивают ее; затем туда помещают 0,67 г сухого CNBr, добавляют небольшое количество воды и растворяют бромциан, плотно закрыв колбу пробкой. При перемешивании (на механической (КРГ) или пропеллерной, но не магнитной

мешалке) раствор бромциана медленно добавляют к суспензии геля, постоянно контролируя значение pH, которое должно оставаться на уровне 11,2 (доводят с помощью 3 М NaOH). Когда pH перестает изменяться и остается на постоянном уровне примерно 6 мин, гель интенсивно промывают водой (1 л), например на воронке Бюхнера.

Связывание белка

Суспензию активированной Сефарозы (20 мл) промывают и соединяют с таким же объемом 0,1 М NaHCO₃, pH 8,2, содержащего 0,5 М NaCl, а затем добавляют 0,2 г белка. Суспензию аккуратно помешивают примерно 3 ч при комнатной температуре или при 4 °С на протяжении ночи. В супернатанте определяют количество свободного белка, чтобы рассчитать количество связавшегося белка. Оставшиеся свободные реакционноспособные группы блокируют, добавляя 5 мл 1 М глицина. Гель промывают сначала 0,1 М ацетатом натрия/уксусной кислотой, pH 4,0, а затем 0,1 М фосфатом калия, pH 7,6. Для хранения в гель добавляют азид натрия (NaN₃) в конечной концентрации 0,1 М.

3.9.3.2 ПРИСОЕДИНЕНИЕ ДИАМИНОГЕКСАНА

Белок может быть связан с твердой подложкой не непосредственно, а через спейсерную группу.

Необходимые реагенты и растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,6

1,6-Диаминогексан (M_r 116,2)

0,5 М NaCl (M_r 58,4; 2,92 г в 100 мл)

^этил-№-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (M_r 191,7)

1 н. HCl

Ход эксперимента

Процедура присоединения спейсерной группы такая же, как и процедура присоединения белка (см. выше), только вместо белка к суспензии активированной Сефарозы добавляют 1 мг/мл (20 мг в 20 мл в приведенной выше методике) 1,6-диаминогексана. Образующееся аминогексильное производное (АГ-Сефароза) промывают раствором 0,5 М NaCl.

Для присоединения к спейсеру белка pH АГ-Сефарозы доводят до 4,5 с помощью 1 н. HCl. Затем добавляют N-3-трип-N'-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид (10 мг/мл геля) и белок (10 мг/мл). Значение pH необходимо поддерживать на уровне 4,5. Смесь перемешивают на протяжении ночи (через 1 ч после начала перемешивания проверяют и доводят значение pH) при 4 °С. Затем гель промывают 0,1 М фосфатом калия, pH 7,6.

3.9.3.3 АКТИВАЦИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПЕРИОДАТОМ

Данную процедуру можно использовать для активации веществ, имеющих соседние спиртовые группы, таких как целлюлоза, агароза и декстраны (Сефароза, Сефадекс и Сефакрил). При окислении периодатом образуются альдегидные группы, которые реагируют с аминогруппами с образованием оснований Шиффа, которые далее можно стабилизировать путем восстановления борогид ридом.

Необходимые реагенты и растворы

Порошок целлюлозы

0,1 М NaHCO₃/0,06 М NaIO₄ (NaHCO₃, M_r 84,0; NaIO₄, M_r 213,9; 8,4 г NaHCO₃ и 12,8 г NaIO₄ в 100 мл воды)

0,1 М карбонатный буфер (NaHCO₃/Na₂CO₃), pH 9,0

Свежеприготовленный раствор NaBH₄ (0,1 г в 10 мл 0,1 М NaOH)

0,1 М ацетат натрия/уксусная кислота, pH 4,0

ФСБ (фосфатно-солевой буфер: 10 мМ фосфат натрия/калия, pH 7,2, 0,8% NaCl, 0,02% KCl)

0,05% Tween 20 в ФСБ

Ход эксперимента

Порошок целлюлозы (2 г) перемешивают в 40 мл 0,1 М NaHCO₃/0,06 М NaIO₄ 2 ч в темноте, а затем промывают 0,1 М карбонатным буфером, pH 9,0. Добавляют белок, который хотят присоединить (около 1 мг/мл, в 40 мл того же буфера), и оставляют гель перемешиваться при комнатной температуре на ночь. Для восстановления оснований Шиффа добавляют 2 мл NaBH₄ и встряхивают 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют еще 2 мл NaBH₄ и вновь перемешивают 30 мин. Твердый порошок промывают 0,1 М раствором ацетата натрия/уксусной кислоты, pH 4,0, буфером ФСБ и 0,05% Tween 20 в ФСБ.

3.9.3.4 ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ БЕЛКОВ (АНТИТЕЛ) С ФЕРМЕНТАМИ (ПЕРОКСИДАЗОЙ)

Необходимые реагенты и растворы

Пероксидаза хрена

Раствор SMCC (4-(1 C -малеимидометил)циклогексанкарбоновой кислоты / V -гидроксисукцинимидный эфир, M_2 334,3; 5 мг растворяют в 60 мкл $M,1\text{C}'$ -диметилформамида при 30 °С)

0,1 М фосфат калия, рН 7,0

0,1 М фосфат калия, рН 6,0

Колонка с Сефадексом G-25, например, 1,5 x 30 см, уравновешенная 0,1 М фосфатом калия, рН 6,0

0,1 М цистамин (M_2 77,2; 77,2 мг в 10 мл воды)

Ход эксперимента

В 1 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0, растворяют 10 мг пероксидазы, нагревают до 30 °С и добавляют 60 мкл раствора SMCC (до конечной концентрации 15 мМ); аккуратно перемешивают 1 ч. Осадок отделяют центрифугированием, а супернатант наносят на колонку с Сефадексом G-25 и элюируют 0,1 М фосфатом калия, рН 6,0. Собирают содержащие пероксидазу фракции (определяют по активности фермента, см. разд. 3.7.4.16, или по поглощению раствора при 280 нм) и путем ультрафильтрации концентрируют до объема 1 мл, а затем добавляют около 10 мг тиозамещенных антител в объеме 1 мл. Инкубируют 1 ч при 30 °С. Оставшиеся свободными малеимидные группы блокируют путем добавления 0,15 мл 0,1 М цистамин. Продукты реакции можно далее подвергнуть очистке методом гель-фильтрации.

Литература

Yoshitake, S., Imagawa, M., Tshikawa, E., Niitsu, Y., Urushizaki, I., Nishiura, M., Kanazawa, R., Kurosaki, H., Tachibana, S., Nakazawa, N., and Ogawa, H. (1982) *J. Biochem.* 92, 1413-1424

3.9.3.5 ВВЕДЕНИЕ ТИОГРУПП В МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛ ИЛИ БЕЛКОВ

Для того чтобы ферменты могли связываться с антителами или другими белками, они должны обладать свободными тио-группами. Такие группы можно ввести в молекулы с помощью специальных реагентов; ниже описана реакция с ангидридом S-ацетилмеркаптоянтарной кислоты.

Необходимые реагенты и растворы

Ангидрид S-ацетилмеркаптоянтарной кислоты (M_r 174,2; 60 мг в 1 мл БI, БI'-диметилформамида)

0,1 М фосфат калия, pH 7,0

Раствор антител или белка (IgG, 10 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,0)

Газообразный азот

0,5 М гидроксиламин ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, M_m 69,5), 0,01 М ЭДТА (M_m 292,3) в 0,1 М Трис-HCl, pH 7,0 (3,46 г $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 0,29 г ЭДТА в 100 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,0)

Колонка с Сефадексом G-25, 1,5 x 30 см, уравновешенная 0,1 М фосфатом калия, pH 6,0, 5 мМ ЭДТА

Ход эксперимента

К 1 мл раствора антител или белка добавляют 0,1 мл раствора ангидрида S-ацетилмеркаптоянтарной кислоты в атмосфере азота, закрывают пробирку и аккуратно перемешивают при комнатной температуре 30 мин. Для удаления ацетогрупп и экспонирования тиогрупп добавляют 0,2 мл раствора 0,5 М гидроксиламина и 0,01 М ЭДТА в 0,1 М Трис-HCl, pH 7,0 и доводят pH до 7,0. Инкубируют при 30 °C 4 мин. Затем смесь наносят на колонку с Сефадексом G-25 и элюируют с помощью раствора 0,1 М фосфата калия, pH 6,0 и 5 мМ ЭДТА. Белковые фракции (детектируемые по поглощению при 280 нм) объединяют и концентрируют до объема 1 мл методом ультрафильтрации.

Литература

Klotz, I. M. and Heiney, R.E. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 605-612

3.9.3.6 КОНЬЮГАЦИЯ (1-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ С АНТИТЕЛАМИ С ПОМОЩЬЮ СЛОЖНОГО ЭФИРА 3-МАЛЕИМИДОБЕНЗОИЛ-N-ГИДРОКСИСУКЦИНИМИДА**Необходимые реагенты и растворы**

Раствор MBS (сложный эфир 3-малеимидобензоил-N-гидрокси-сукцинимид, M_r 314,3; 20 мг/мл в диоксане)

Раствор антител (IgG, 1 мг/мл в 0,05 М NaCl, 0,1 М фосфате калия, pH 7,0)

P-Галактозидаза (из *E. coli*)

Колонка с Сефадексом G-25, 1 x 30 см, уравновешенная 0,1 М фосфатом калия, pH 7,0, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl
1 М 2-меркаптоэтанол (M_T 78,1; 0,78 г в 10 мл)
0,1 М дитиоэритритол (ДТЭ, M_m 154,2; 154 мг в 10 мл)

Ход эксперимента

К 1 мл раствора антител добавляют 1 мкл раствора MBS и инкубируют при 25 °С 1 ч. Свободный реагент удаляют на колонке с Сефадексом G-25 и элюируют продукт с помощью буфера, как описано выше. К общей фракции белка (детектируют по поглощению при 280 нм) немедленно добавляют 2 мг (5-галактозидазы и инкубируют 1 ч при 30 °С. Реакцию останавливают путем добавления 0,1 М раствора ДТЭ (50 мкл/мл).

Литература

Kitagawa, T. and Aikawa, T. (1976) *J. Biochem.* 79, 233-236

3.9.3.7 КОНЬЮГАЦИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ С АНТИТЕЛАМИ С ПОМОЩЬЮ ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА

Необходимые реагенты и растворы

Глутаровый альдегид (M_p 100,1; 50%-ный водный раствор, фирменный препарат)

Щелочная фосфатаза (из слизистой кишечника быка, 10 мг/мл)
0,5 М Трис-НСl, pH 8,0

Раствор антител IgG (10 мг/мл в буфере — ФСБ или 0,05 М Трис-НСl, pH 8,0)

ФСБ (фосфатно-солевой буфер: 10 мМ фосфат натрия/калия, pH 7,2, 0,8% NaCl, 0,02% KCl)

БСА (бычий сывороточный альбумин)

Диализные мешки (например, фирмы Visking)

Ход эксперимента

Проводят диализ 25 мг щелочной фосфатазы и 10 мг антител в соответствующем объеме против ФСБ на протяжении ночи, несколько раз сменяя раствор ФСБ. К раствору белка после диализа добавляют глутаровый альдегид в конечной концентрации 2% (об./об.) и аккуратно перемешивают 2 ч при 4 °С. Диализуют против ФСБ 6 ч, а затем на протяжении ночи при 4 °С — против 0,5 М Трис-НСl, pH 8,0. Для хранения в раствор добавляют 1% БСА.

3.9.3.8 ПЕРЕКРЕСТНОЕ СШИВАНИЕ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ДИМЕТИЛСУБЕРИМИДАТА

Данный метод подходит для широкого спектра реакций, приводящих к образованию перекрестных сшивок; это один из старейших и наиболее хорошо изученных методов. С его помощью можно создать внутримолекулярные мостики в молекуле белка, а также соединить между собой разные белки. Это удобный способ изучения белковых субъединиц. Количество перекрестных сшивок зависит от расстояния между реакционными группами и их активности. Изменяя время инкубации, можно постепенно увеличивать число перекрестных сшивок в белке и получать информацию о его трехмерной структуре. Существуют серии гомологичных линкеров, различающихся длиной цепи, которые позволяют соединять белковые субъединицы, находящиеся на разном расстоянии друг от друга.

Необходимые реагенты и растворы

0,2 М гидрохлорид триэаноламина, рН 8,5

Диметилсуберимидат (дигидрохлорид, M_m 273,2; непосредственно перед использованием готовят раствор в 0,2 М гидрохлориде триэаноламина, рН 8,5 (см. ниже), например, 3 мг/мл).

Ход эксперимента

Смешивают раствор диметилсуберимидата (конечная концентрация должна составлять 1-12 мг/мл) с раствором белка с концентрацией 0,4-5 мг/мл в 0,2 М гидрохлориде триэаноламина, рН 8,5. Инкубируют 3 ч при комнатной температуре и проводят диализ против буфера с нейтральным значением рН.

Литература

Carpenter, F.H. and Harrington, K.T. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5580-5586
Davies, G.E. and Stark, G.R. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 651-656

Общая литература

Kemeny, D.M. and Challacombe, S.J. (1988) *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays*. J. Wiley and Sons, Chichester
Nowotny, A. (1979) *Basic Exercises in Immunochemistry*, Springer-Verlag, Berlin
Tijssen, P. (1985) *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier, Amsterdam

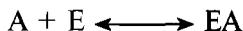
4

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ

4.1 НЕОБРАТИМОЕ, ОБРАТИМОЕ, СПЕЦИФИЧЕСКОЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

4.1.1 Общие замечания

Для характеристики систем, не обладающих ферментативной активностью, таких как комплексы антигенов и антител, рецепторов и лигандов, а также транспортные системы, ценную информацию можно получить при изучении процесса связывания. Но и в случае ферментов изучение связывания является важным элементом анализа каталитической реакции. В этой связи термины «макромолекула» и «фермент» в контексте данной главы являются синонимами. Анализировать равновесие в процессе связывания проще, чем кинетику ферментативной реакции, поскольку связывание происходит всего в одну стадию:



Напротив, ферментативные процессы включают в себя несколько последовательных стадий, среди которых связывание субстратов, продуктов, коферментов, кофакторов и эффекторов, а также стадии каталитического превращения. Самым сложным моментом при изучении связывания является детекция, поскольку, в отличие от химического превращения субстрата в продукт в ходе ферментативной реакции, при установлении равновесия связывания компоненты обычно остаются незаряженными и степень связывания лиганда с макромолекулой установить нелегко. Если лиганд (кофактор, активатор или ингибитор) оказывает влияние на ход ферментативной реакции, но сам при этом не претерпевает превращений, для изучения процесса связывания можно воспользоваться кинетическими данными.

Введем понятие обратимого и необратимого связывания, хотя в некотором роде это разграничение условно, так как необратимость того или иного процесса определяется лишь временем наблюдения. Обратимыми считают такие процессы, в которых обратные превращения начинаются практически немедленно, т.е. во временном диапазоне нескольких миллисекунд или наносекунд. Таким образом, в обычной экспериментальной процедуре

разделения невозможно отделить свободный компонент от связанного, поскольку связанный компонент быстро диссоциирует из комплекса, так что удастся выделить лишь несвязанные компоненты (лиганды и макромолекулы). Необратимо связывающиеся компоненты нельзя разделить таким способом.

К необратимому связыванию относится ковалентное взаимодействие лигандов с макромолекулами, например, вещество с активными галогенными или тиогруппами может атаковать любые аминокислотные или сульфгидрильные группы белка и связываться с ним неспецифическим образом. Специфические лиганды, связывающиеся с ферментами необратимым образом, иногда называют суицидными субстратами; они связываются в активном центре ферментов вместо нормальных субстратов. Далее такой лиганд в какой-то степени подвергается обычным каталитическим превращениям, однако образующийся при этом промежуточный продукт остается ковалентно связанным с активным центром, блокируя его. Аналоги переходного состояния связываются в активном центре нековалентным образом и имитируют переходное состояние каталитической реакции превращения субстрата в продукт. В соответствии с теорией переходного состояния в этот момент субстраты (а, следовательно, и соответствующие аналоги переходного состояния) имеют очень высокое сродство к активному центру фермента. Тиаминтиазолондифосфат (аналог переходного состояния тиаминдифосфата — кофактора окислительного декарбоксилирования ос-оксокислот) не удается отделить от фермента даже путем продолжительного диализа. В качестве других примеров квази-необратимого связывания можно назвать связывание антигенов и антител и реакцию авидина с биотином. Нековалентное необратимое взаимодействие характеризуется очень низкой константой диссоциации $K_a < 10^{6-10}$ М.

Обратимое связывание лигандов с ферментами можно подразделить на специфическое и неспецифическое. На поверхности белков имеются ионизируемые группы и гидрофобные участки, что создает возможность для взаимодействия со свободными компонентами — анионами, катионами (ионами металлов), детергентами (SDS) и хромофорами (например, Кумасси бриллиантовым синим, который используется для количественного определения белков и окрашивания гелей после электрофоретического разделения белков). Для такого рода связывания не нужны специфические участки. Неспецифическое связывание часто (но не всегда) характеризуется относительно высокой константой диссоциации ($K_d > 10^{-3}$ М).

Константы диссоциации специфического обратимого связывания обычно лежат в диапазоне между константами квази-необратимого и неспецифического связывания, хотя бывают и исключения (например, связывание сахаров типа глюкозы с различными ферментами или пероксида водорода с каталазой). Слишком сильное связывание субстрата, продукта или эффектора с ферментом нежелательно, поскольку оно блокирует действие фермента. Под специфическим связыванием обычно понимают взаимодействие определенного лиганда (часто имеющего меньшую молекулярную массу по сравнению с молекулярной массой той макромолекулы, с которой он связывается) со специфическим участком макромолекулы, таким как активный или регуляторный центр.

Выявить необратимое или квази-необратимое связывание довольно легко, так как связанные компоненты стабильно удерживаются вместе и могут быть выделены в виде комплекса. Степень связывания можно определить с помощью ряда методов с использованием метки, в частности с помощью радиоизотопного или флуоресцентного анализа. Напротив, неспецифическое связывание изучать сложнее, особенно на количественном уровне, поскольку оно слабее. Так как для неспецифического связывания не нужны определенные участки связывания, насыщение в этом случае обычно не достигается, в отличие от специфического связывания, достигающего насыщения при полной занятости всех центров связывания. Таким образом, при увеличении концентрации лиганда кривая специфического связывания в какой-то момент выходит на плато, а кривая неспецифическош связывания продолжает возрастать линейным образом (рис. 4.1).

Специфическое и неспецифическое связывание можно различить с помощью конкурентного анализа. Два вещества со сходной структурой (аналоги) способны связываться с одним и тем же центром, но с разным сродством. Таким образом, если к ферменту добавить определенное количество первого соединения, центры связывания окажутся занятыми уже до добавления второго соединения. Однако в связи с быстрой обратимостью процесса связывания при добавлении второго соединения часть первого соединения будет диссоциировать и замещаться вторым соединением. Степень замещения вторым (конкурирующим) веществом зависит от его концентрации и сродства. Можно себе представить, что при очень большом избытке второго вещества оно полностью вытеснит первое вещество (напротив, большой избыток первого вещества предотвратит его вытеснение вторым веществом). Если



Рис. 4.1. Специфическое и неспецифическое связывание

же два вещества связываются с различными участками макромолекулы, они будут связываться независимо и не будут вытеснять друг друга. То же происходит и при неспецифическом связывании. Таким образом, наличие конкуренции четко указывает на существование специфического связывания. Однако, как будет показано далее, продемонстрировать наличие конкуренции и однозначно интерпретировать результаты иногда бывает непросто.

4.1.2 Экспериментальные аспекты

Существует несколько методов изучения обратимого специфического связывания, однако при кажущемся богатстве выбора оказывается, что каждый из методов имеет свои ограничения, так что для каждого конкретного случая бывает довольно сложно подобрать подходящий метод исследования. Основная проблема — обнаружение лабильного комплекса лигандов с макромолекулами. Поскольку химическая природа реагирующих веществ при образовании комплекса не меняется, единственным достоверным критерием связывания является разница относительной молекулярной массы свободного низкомолекулярного лиганда и лиганда, связанного с макромолекулой. Следовательно, для обнаружения связывания можно использовать методы, позволяющие определять различия молекулярных масс веществ, если при этом не сдвигается равновесие реакции связывания. Если же при связывании происходит характерное изменение свойств лиганда или

макромолекулы (чаще всего речь идет об изменении оптических параметров), разделение производить не обязательно, так что все измерения можно проводить, не нарушая равновесия. Такие методы являются более предпочтительными. Однако различия оптических характеристик связанных и свободных компонентов обычно весьма незначительны (или их нет вовсе), так что далеко не все системы можно изучать подобным образом. Ниже обсуждаются оба типа экспериментов — основанных на разделении по молекулярным массам и на изменении оптических параметров. Однако сначала несколько слов скажем о постановке эксперимента по изучению связывания лигандов с макромолекулами.

41.2.1 КОЛИЧЕСТВО ФЕРМЕНТА ИЛИ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

По сравнению с количеством фермента, необходимым для изучения кинетики ферментативной реакции, для изучения связывания требуется чрезвычайно большое количество макромолекул. Это объясняется тем, что в данном случае фермент рассматривается не в качестве катализатора, а в качестве партнера лиганда во взаимодействии, в связи с чем оба вещества должны присутствовать в сравнимых количествах. Кроме того, интенсивность сигнала, отражающего взаимодействие, прямо пропорциональна количеству фермента: чем больше фермента, тем выше уровень сигнала и тем лучше результат. Поскольку сигнал обычно очень низкий, только при высокой концентрации фермента есть шанс зарегистрировать взаимодействие. В зависимости от конкретного метода анализа для проведения одного эксперимента по изучению связывания требуется до нескольких миллиграммов макромолекул. Следовательно, при планировании экспериментов по связыванию следует предусмотреть возможность получения необходимого количества материала.

4.1.2.2 СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТА ИЛИ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

Эксперименты по изучению связывания должны проводиться в условиях, максимально приближенных к физиологическим условиям, поскольку иначе трудно экстраполировать полученные результаты на реальную ситуацию в метаболизме. Следовательно, нужно поддерживать физиологическую температуру, например 37 °C, поскольку равновесие реакции сильно зависит от температуры. Это может повлечь за собой проблемы, поскольку многие ферменты довольно нестабильны при такой температуре, особен-

но это относится к таким экспериментам, которые продолжаются длительное время, например к равновесному диализу. Кроме того, следует учесть воздействие рН, ионной силы и неспецифических взаимодействий. В связи с этим в предварительном эксперименте следует установить стабильность макромолекул в условиях проведения эксперимента; любое ослабление функциональной активности может быть сопряжено с изменением параметров связывания. В случае ферментов следует сравнить активность до и после проведения эксперимента, однако и для некаталитических макромолекул следует подтвердить сохранение функциональной активности с помощью подходящего теста. Как минимум, требуется определить концентрацию белка до и после эксперимента, поскольку эти данные могут выявить осаждение белка в результате денатурации.

4.1.2.3 СТАБИЛЬНОСТЬ ЛИГАНДА

Сказанное выше о стабильности макромолекул относится и к лигандам, хотя простая химическая структура последних обычно означает их меньшую зависимость от факторов окружающей среды, в частности от температуры. Однако некоторые лиганды могут вступать с макромолекулами в спонтанные реакции, иногда неспецифическим образом. Если лигандами являются субстраты или продукты, следует создать условия, в которых их ферментативные превращения происходить не могут. Поскольку в экспериментах по связыванию требуется большое количество фермента, предотвратить реакцию бывает непросто. Если ферментативная реакция протекает с участием единственного субстрата, то ее предотвратить невозможно, и в таких случаях удастся изучать связывание только неактивного аналога субстрата. Если в каталитической реакции принимают участие несколько субстратов, а также кофактор или другой важный компонент (например, ион металла), их удаление делает невозможным протекание реакции и позволяет изучить связывание одного субстрата или компонента. Однако следует учесть, что ввиду высокой концентрации фермента даже следы кофактора или косубстрата вызывают мгновенную конверсию субстрата. Кроме того, в некоторых случаях происходит адсорбция лиганда на стенках реакционного сосуда (особенно, если он изготовлен из синтетического материала), что снижает эффективную концентрацию лиганда. В предварительных экспериментах следует удостовериться в том, что в процессе анализа лиганд не подвергается никаким изменениям.

4.1.2.4 КОНЦЕНТРАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ

При проведении экспериментов по связыванию лигандов с макромолекулами рекомендуется работать в строго определенном диапазоне концентраций обоих компонентов, которые отличаются от тех, в которых работают при анализе активности ферментов (при насыщающей концентрации субстрата) или при изучении ферментативной кинетики (при концентрации субстрата вблизи константы Михаэлиса; причем в обоих случаях концентрация фермента должна быть минимальной). При изучении связывания концентрация лиганда должна изменяться вблизи константы диссоциации (примерно на порядок выше и ниже этой величины), однако для получения надежных результатов обычно требуется провести довольно большое количество измерений.

Как уже отмечалось выше, диапазон концентраций макромолекул должен соответствовать диапазону концентраций лиганда, поскольку интенсивность сигнала прямо пропорциональна количеству макромолекул. При этом определенные ограничения накладывает обычно высокая стоимость фермента и тот факт, что макромолекулы не всегда можно получить в любой концентрации. Например, 1 М раствор лактатдегидрогеназы должен содержать 140 г фермента в 1 мл, что абсолютно невозможно. Из-за высокой вязкости очень сложно работать с растворами белков, концентрация которых превышает 20 мг/мл, поэтому, например, для изучения взаимодействий лактатдегидрогеназы ее концентрация в растворе не должна превышать 0,1 мМ (14 мг/мл). Следовательно, если учесть значение константы связывания, становится понятно, что связаться могут лишь некоторые молекулы лиганда, а поскольку из соображений экономии материала объем реакции должен быть минимальным, искомое значение вполне может оказаться за пределами обнаружения; так, в нашем примере при объеме реакции 0,1 мл необходимо иметь возможность детектировать <10 нмоль лиганда. Этот пример подчеркивает необходимость использования очень чувствительных методов детекции, в частности, в экспериментах подобного рода часто работают с радиоактивными метками.

4.2 АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ

Некоторые методы, применяемые для разделения макромолекул разных размеров, пригодны также для отделения свободного низкомолекулярного лиганда от лиганда, связанного с

макромолекулой с большой молекулярной массой. Однако эти методы должны быть модифицированы таким образом, чтобы разделение не приводило к сдвигу равновесия между свободными и связанными компонентами. Такое «разделение без разделения» возможно, например, в небольшой части объема реакционной смеси, когда общее равновесие в системе не затрагивается. Очевидный недостаток такого подхода состоит в том, что для измерения оказывается доступна лишь малая часть всего образца, а основная его часть служит для поддержания равновесия. В результате подобные методы оказываются недостаточно точными и используются в основном для предварительного обнаружения специфического связывания; для более точного определения необходимы другие методы.

4.2.1 Ультрафильтрация

Для отделения макромолекул со связанным лигандом от свободного низкомолекулярного лиганда можно использовать ультрафильтрацию, ультрацентрифугирование и гель-фильтрацию. Для ультрафильтрации существует множество различных приспособлений (подробно на их устройстве мы здесь не останавливаемся, см. разд. 3.8.3.2). Объем реакционной смеси играет очень важную роль и должен быть минимальным; он определяется количеством имеющихся в распоряжении реагирующих веществ (особенно макромолекул) и типом мембраны. Предел исключения мембраны должен находиться в интервале между размерами лиганда и макромолекулы. Важное значение также имеет материал, из которого изготовлена мембрана. Существует несколько типов синтетических мембран; предпочтение отдается тем мембранам, на которых не происходит налипания и агрегации белка. В случае ячеек небольшого размера раствор продавливают через мембрану под действием сжатого воздуха. Например, маленькие ячейки для ультрафильтрации могут быть напрямую соединены со шприцем. В других устройствах продавливание раствора через мембрану происходит за счет центробежного ускорения (настольная центрифуга). Кроме того, существуют мембраны для специальных воронок, через которые раствор проходит при подключении вакуума.

Все устройства подобного рода можно использовать при анализе связывания. Эксперимент должен быть построен таким образом, чтобы буферный раствор, содержащий определенные количества макромолекул (например, фермента) и лиганда, быстро

отфильтровывался, причем через фильтр должна проходить лишь малая часть (не более 5-10%) всего раствора. В фильтрате содержится лиганд в концентрации, соответствующей концентрации свободного лиганда в реакционной смеси ($[A]$). Эту концентрацию следует измерить и вычесть из общего количества лиганда, использовавшегося для проведения эксперимента ($[A]_0$); разность будет соответствовать количеству связанного лиганда: $[A]_{\text{связ}} = [A]_0 - [A]$. Исходное количество добавленного лиганда $[A]_0$ должно быть известно, однако его также следует определить в реакционной смеси до фильтрования, поскольку определенная доля лиганда может быть утеряна в результате неспецифических взаимодействий с мембраной или стенками реакционного сосуда. Для детекции нужны очень чувствительные методы, например, с включением в молекулу лиганда радиоактивной или флуоресцентной метки. Следует помнить, что метод детекции не может и не должен различать свободный и связанный лиганд. Это справедливо в случае радиоактивной метки или образования окрашенного продукта; однако интенсивность флуоресценции свободного и связанного лиганда может различаться, так что при наличии в анализируемом растворе обеих форм лиганда невозможно получить достоверный результат.

Для количественного анализа связывания следует провести серию измерений в системе с переменной концентрацией лиганда при постоянной концентрации макромолекул. Например, для проведения параллельных экспериментов создан ряд устройств, в частности, аппарат Паулюса (1969).

Литература

Paulus, H. (1969) *Anal. Biochem.* 32, 91 -100

4.2.2 Равновесный диализ

Равновесный диализ можно рассматривать как классический метод изучения связывания. Метод не является очень точным или очень чувствительным, но он надежен и применим практически к любой системе, в которой происходит связывание, если только найден подходящий способ детекции лиганда. Соответствующее устройство изготовить несложно (Englund et al., 1969). Но даже без подобного устройства равновесный диализ можно осуществить с помощью фирменного диализного мешка (например, фирмы Visking^R; один слой такого мешка также можно использовать в качестве полупроницаемой мембраны в диализном устройстве).

Определенный объем раствора макромолекул помещают в мешок, завязывают концы и помещают в небольшую пробирку с равным объемом раствора лиганда. Для проведения полного эксперимента требуется использовать несколько пробирок с разной концентрацией лиганда при постоянной концентрации раствора макромолекул.

Принцип действия устройства для проведения равновесного диализа такой же. Изготовленный из синтетического материала (тефлона или плексигласа) цилиндр разрезают поперек и продельывают круглые отверстия в каждой части, так что каждая половина представляет собой своеобразный небольшой стакан, служащий диализной ячейкой. Диаметр и глубина отверстий определяют реакционный объем, так что устройство легко адаптировать к требованиям эксперимента. Если количество образца ограничено, можно создать ячейку объемом порядка 50-100 мкл (например, диаметр 6 мм и глубина 4 мм). Диализную мембрану размещают между половинками цилиндра и соединяют половинки между собой таким образом, что образуются два отсека, разделенные мембраной. Диализную ячейку устанавливают в держателе и скрепляют половинки между собой. Для заполнения ячейки растворами и для отбора образца в каждой части ячейки просверливают по два небольших отверстия (одно отверстие для заполнения ячейки с помощью шприца, а другое — для отвода воздуха). В процессе диализа отверстия должны быть закрыты пробками.

В одну половинку ячейки помещают раствор макромолекул, а в другую — раствор лиганда. В одном устройстве одновременно может быть установлено от 10 до 20 диализных ячеек для проведения параллельных экспериментов с разной концентрацией лиганда. Для большей эффективности диализа ячейки медленно поворачивают, а температуру поддерживают на постоянном уровне, поэтому держатель с цилиндрами следует подсоединить к мотору и поместить в термостат.

В процессе диализа свободный лиганд равномерно распределяется по двум отсекам ячейки, но связанный с макромолекулой лиганд не может проникать сквозь мембрану. В результате в том отсеке, куда исходно помещали лиганд, его концентрация соответствует равновесной концентрации свободного лиганда ($[A]$). Такое же количество свободного лиганда находится и во втором отсеке, однако там, кроме того, содержится связанный с макромолекулой лиганд, т. е. общая концентрация лиганда во втором отсеке составляет $[A] + [A]_{\text{связ}}$. После установления рав-

новесия из каждого отсека отбирают пробы и определяют в них концентрацию лиганда.

Для каждого типа аппарата и для каждой реакционной системы следует определить минимальное время диализа, что особенно важно для лабильных белков. Однако обязательно нужно дождаться достижения равновесия, в противном случае будут получены ошибочные результаты. Длительность проведения диализа следует установить в предварительном эксперименте. Сначала раствор лиганда с определенной концентрацией в буфере или в воде помещают в ячейку, а в другой отсек ячейки помещают просто буфер или воду. Лиганд диффундирует во второй отсек ячейки до уравнивания его концентрации в обоих отсеках. Чтобы установить момент наступления равновесия, через определенные промежутки времени из обоих отсеков отбирают пробы раствора и измеряют в них концентрацию лиганда (можно также использовать несколько диализных ячеек, заполненных одинаковым образом, и измерять в них по очереди концентрацию лиганда). В том отсеке, куда исходно был помещен лиганд, его концентрация должна снижаться по экспоненциальному закону, стремясь к *половине исходного* значения, а во втором отсеке должно происходить симметричное увеличение концентрации лиганда; минимальное время диализа — это время, через которое оба значения становятся одинаковыми. Следует учесть, что разные лиганды, даже имеющие одинаковый размер, могут проникать через мембрану с разной скоростью, так что время диализа следует устанавливать независимо для каждого лиганда, даже при условии использования одного и того же диализного аппарата.

4.2.2.1 СВЯЗЫВАНИЕ ИНДОЛА С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Данный показательный эксперимент может быть использован для демонстрации принципа равновесного диализа. Бычий сывороточный альбумин недорог и доступен в любом количестве. В связи с этим для детекции можно использовать менее чувствительный метод с образованием окрашенного продукта, а радиоактивная метка не требуется. Константу диссоциации fQ и число центров связывания в молекуле альбумина и можно рассчитать с достаточно высокой точностью. Тем не менее, следует стремиться к уменьшению разброса данных, который при проведении анализа этим методом может быть достаточно велик. Данный эксперимент также может быть осуществлен с помощью других методов, таких как ультрафильтрация или ультрацентрифугирование.

Сывороточный альбумин, важный транспортный белок крови, обладает уникальной структурой, а именно состоит из набора повторяющихся единиц, образующих три похожих домена с центрами связывания жирных кислот, желчных пигментов типа билирубина, а также триптофана (Peters, 1985). Данный эксперимент позволяет изучать связывание именно в последнем центре; вместо аминокислоты используют индол. Это соединение можно количественно определить с помощью реактива Эрлиха, который образует с индолом окрашенный продукт (рис. 4.2).

В предварительном эксперименте следует построить стандартную кривую для определения окрашенного продукта, затем найти минимальное время диализа, а уже потом изучать процесс связывания. На данном примере обсудим общие правила измерения и оценки результатов экспериментов по связыванию.

Необходимые реагенты и растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,0

0,1 мМ бычий сывороточный альбумин (M_r 68 000; 68 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,0)

0,1 М индол (M_r 117,2; 1,17 г в 100 мл изопропанола; дальнейшие разведения производят в 0,1 М растворе фосфата калия, pH 7,0)

5,0 н. KOH (M_m 56,1; 28 г в 100 мл воды)

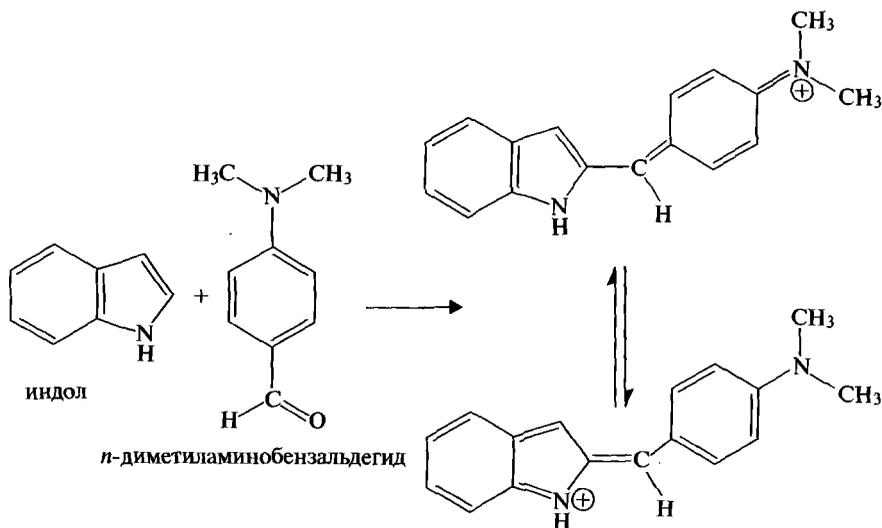


Рис. 4.2. Реакция индола с реактивом Эрлиха

Толуол

Этанол

Реактив Эрлиха'. 9 г и-диметиламинобензальдегида при перемешивании растворяют в 205 мл этанола; очень медленно добавляют 13 мл концентрированной серной кислоты (надеть защитные очки!) и доводят общий объем до 250 мл этанолом. Непосредственно перед использованием разбавляют 1 часть реагента 2 частями этанола (хранят только неразбавленный реагент, он стабилен несколько месяцев при комнатной температуре).

Материалы и оборудование

Диализные мешки или мембраны, например, фирмы Visking
Диализный аппарат (как описан выше: из 10-20 диализных ячеек, каждая из которых состоит из двух отсеков с объемом 1 мл, например диаметром 12 мм и глубиной 9 мм)

Центрифуга

Фотометр (видимый диапазон)

Стеклоянная кювета

Определение индола и построение калибровочной кривой

В центрифужной пробирке на 1,5 мл смешивают 0,25 мл раствора индола (запасной раствор разбавляют 0,1 М фосфатом калия, рН 7,0, до конечных концентраций, указанных далее) и 10 мкл 5,0 н. КОН, а затем добавляют 1 мл толуола. После тщательного перемешивания пробирки плотно закрывают и центрифугируют 5 мин. Из верхней органической фазы отбирают 0,2 мл жидкости и переносят в новую пробирку, куда также добавляют 1,2 мл разбавленного реактива Эрлиха. Образцы перемешивают и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. Измеряют поглощение при 572 нм (или 578 нм в фильтровом фотометре). Для приготовления раствора сравнения вместо раствора индола берут 0,25 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,0, и проводят с ним те же манипуляции. Калибровочную кривую строят по 10 точкам в диапазоне концентраций индола от 10^{-5} до 10^{-3} М; калибровочную кривую и раствор сравнения используют для определения концентрации индола при проведении диализа.

Подготовка диализной мембраны

Перед проведением эксперимента необходимо отрезать фрагмент диализной мембраны такого размера, чтобы он полностью перекрывал поверхность между двумя частями диализ-

ной ячейки. Поскольку диализные мешки исходно являются двухслойными, их также следует разрезать вдоль и раскрыть. Перед использованием фрагменты мембраны кипятят 5 мин в воде, добавляя туда несколько кристаллов ЭДТА (~5 мМ) для связывания ионов тяжелых металлов. Затем мембрану споласкивают водой и натягивают между отсеками диализной ячейки. Мембрана не должна высохнуть, поэтому ячейку следует заполнить сразу после сборки.

Определение минимального времени диализа

Готовят 10 диализных ячеек. В один отсек каждой ячейки (например, в правый) помещают 1 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М индола в 0,1 М фосфате калия, pH 7,0, а в другой (левый) помещают 0,1 М фосфат калия, pH 7,0. Эту процедуру следует выполнить быстро, а затем разместить ячейки во вращающемся держателе, чтобы начать диализ. Через определенный промежуток времени из обоих отсеков первой ячейки отбирают пробы объемом 0,25 мл; затем через чуть больший промежуток времени (см. ниже) отбирают пробы из другой ячейки и т.д. Во всех аликвотах, а также в исходном растворе индола, не подвергнутом диализу, определяют концентрацию индола. Строят два графика, на которых откладывают значения поглощения растворов соответственно в правых и в левых отсеках ячеек от времени диализа. Момент времени, в который обе кривые пересекаются, можно считать минимальным временем диализа и использовать именно это время диализа в последующем эксперименте по связыванию. Временные интервалы для отбора проб, а также общая длительность эксперимента зависят от конкретных условий диализа, в частности от устройства диализного аппарата. Обычно равновесие в диализе достигается примерно за два часа. Поскольку изменение концентрации лиганда происходит по экспоненциальной зависимости, рекомендуется отбирать пробы через неравные промежутки времени — более короткие в начале эксперимента и более длинные в конце.

Связывание индола с бычьим сывороточным альбумином

Готовят не менее 10 диализных ячеек с мембраной, как описано выше. В один отсек каждой ячейки (например, в правый) помещают 1 мл 0,1 мМ БСА в 0,1 М фосфате калия, pH 7,0. В другой (левый) отсек каждой ячейки помещают раствор индола в концентрации от $2 \cdot 10^{-5}$ до $2 \cdot 10^{-3}$ М. Разведение раствора

индола производят *перед* заполнением ячейки. Как правило, в экспериментах по анализу связывания конечная концентрация лиганда (с учетом двукратного разведения раствора индола в результате его распределения между двумя отсеками ячейки) должна находиться в диапазоне концентраций, отличающихся на один порядок величины в большую и в меньшую стороны от константы диссоциации (в случае индола $K_d = 0,08$ мМ). Однако, поскольку это относится к концентрации свободного лиганда в состоянии равновесия ($[A]$), необходимо использовать более высокую исходную концентрацию лиганда. Диализ следует проводить при постоянной температуре (25 °С). После проведения диализа (минимальное время диализа плюс 30 мин, чтобы наверняка достичь равновесия в диализе и в связывании лиганда с белком) во всех ячейках определяют концентрацию индола. Полученные данные обрабатывают так, как это описано в разд. 4.2.3.

Литература

- Englund, P.E., Huberman, J.A., Jovin, T.M., and Komberg, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3038-3044
 Peters, T. (1985) *Adv. Prot. Chem.* 37, 161-245

4.2.3 Обработка результатов эксперимента по изучению связывания

Принцип обработки результатов эксперимента по изучению связывания один и тот же во всех случаях (обработка результатов титрования описана в разд. 4.3.1.2); продемонстрируем его на примере упоминавшегося выше равновесного диализа. Обычно в эксперименте определяют концентрацию свободного лиганда $[A]$ (концентрацию индола в «левом» отсеке диализной ячейки или в фильтрате после ультрафильтрации). Концентрацию связанного лиганда $[A]_{\text{связ}}$ определяют, измеряя значение концентрации в реакционной среде (в «правом» отсеке в эксперименте с равновесным диализом) и вычитая из него концентрацию $[A]$:

$$[\text{индол}]_{\text{связ}} = [\text{индол}]_{\text{правый отсек}} - [\text{индол}]_{\text{левый отсек}}$$

В других методах, таких как ультрафильтрация и ультрацентрифугирование, значение $[A]_{\text{связ}}$ нельзя определить таким способом, поэтому его вычисляют по разности между общей концентрацией лиганда $[A]_0$, соответствующей его концентрации до проведения эксперимента, и концентрацией свободного лиганда $[A]$:

$$[A]_{\text{связ}} = [A]_0 - [A]$$

Такой подход не лишен определенных недостатков, поскольку в ходе эксперимента могут иметь место неспецифические потери лиганда, например, в результате его адсорбции на стенках сосудов или на мембране. Прямое определение концентрации после проведения эксперимента позволяет избежать подобных ошибок.

В результате проведения серии параллельных экспериментов с различной концентрацией лиганда и постоянной концентрацией макромолекул получают несколько наборов данных, по которым строят графики в соответствии со следующим уравнением:

$$[A]_{\text{связ}} = \frac{y[E]_0[A]}{K_d + [A]} \quad (4.1)$$

По оси абсцисс откладывают значения $[A]$, а по оси ординат — значения $[A]_{\text{связ}}$. Обычно график представляет собой гиперболическую кривую с насыщением, напоминающую кривую, соответствующую кинетике Михаэлиса-Ментен (см. разд. 3.2). Существенное различие состоит в том, что при графическом изображении кинетических данных по оси абсцисс обычно откладывают общее количество лиганда (или субстрата), т.е. $[A]_0$, а не количество свободного лиганда $[A]$. Такое различие можно считать несущественным до тех пор, пока количество связанного лиганда можно не учитывать (это справедливо в экспериментах по определению кинетических закономерностей ферментативных реакций, в которых используют лишь очень небольшое количество фермента). В таких случаях $[E] \ll [A]_0$ и, следовательно, $[A]$ и $[A]_0$. При анализе связывания, когда используют высокую концентрацию макромолекул, такое упрощение недопустимо.

Гиперболическая кривая в бесконечности стремится к значению $y[E]_0$, поскольку при $[A] \rightarrow \infty$ значение K_d становится $\ll [A]$, а уравнение 4.1 приходит к виду $[A]_{\text{связ}} = y[E]_0$. В реальности бесконечные концентрации недостижимы, поэтому «насыщающими» концентрациями считают концентрации $[A]$, которые превосходят K_d как минимум в 10 раз (хотя это не совсем справедливо, см. разд. 3.2), так что значения по оси ординат в этой области принимают равными $y[E]_0$. Поскольку значение $[E]_0$ обычно известно, можно найти число центров связывания y . При $[A] = K_d$ уравнение 4.1 упрощается и принимает вид $[A]_{\text{связ}} = y[E]_0/2$, т.е. концентрация свободного лиганда при полунасыщении равна константе диссоциации, которую можно найти, исходя из этих данных.

Дальнейшее упрощение состоит в том, что общую концентрацию макромолекул в ходе эксперимента считают постоянной, а

соотношение $[A]_{\text{связ}}/[E]_0$ обозначают через z , где z — доля лиганда, связанного с каждой макромолекулой. В таком случае уравнение 4.1 принимает следующий вид:

$$r = \frac{n[A]}{K_d + [A]} \quad (4.2)$$

В этом случае кривая при насыщении стремится к значению n . В особых случаях (например, при анализе результатов титрования, см. разд. 4.3.1.2) вводят дополнительное обозначение: $Y = z/n = [A]_{\text{связ}}/n[E]_0$ (доля лиганда, связанного в одном центре связывания).

Проблему недооценки величины насыщающей концентрации и, следовательно, константы диссоциации можно решить, если привести уравнение связывания к линейному виду, в результате чего становится возможным определить константы непосредственно из графика. Такая процедура, кроме того, позволяет выявить отклонения от нормального связывания. Из трех простых линейных преобразований уравнения связывания чаще всего используются два (см. обсуждение всех вариантов линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен). При построении графика в соответствии с уравнением (в двойных обратных координатах):

$$\frac{1}{r} = \frac{K_d}{n[A]} + \frac{1}{n} \quad (4.3)$$

в координатах $1/r$ от $1/[A]$ получают прямую линию. При экстраполяции прямой до пересечения с осью ординат получают значение $1/n$ при насыщении. При экстраполяции прямой до оси абсцисс получают значение $\sqrt{K_d}$, а тангенс угла наклона прямой равен K_d/n . Однако таким графиком пользуются не очень часто из-за довольно больших искажений концентрации свободного лиганда по оси абсцисс и погрешности измерений по оси ординат. Область высоких концентраций с соответствующей погрешностью оказывается довольно сильно сжатой вблизи начала координат, а область низких концентраций с соответствующей погрешностью оказывается весьма растянутой. В связи с этим для оценки данных следует применять не регрессионный анализ, а, скорее, взвешенную регрессию (см. Bisswanger, 2002). Кроме того, при таком способе линеаризации данных определение числа центров связывания n также сопряжено с большой ошибкой.

Наиболее надежным и наиболее часто используемым графиком для анализа результатов связывания является график в

координатах Скэтчарда. Соответствующее уравнение получают, умножая уравнение 4.3 на отношение nr/K_d :

$$\frac{r}{[A]} = \frac{n}{K_d} - \frac{r}{K_d} \quad (4.4)$$

Тангенс угла наклона прямой составляет $-1/K_d$, точка пересечения с осью ординат соответствует n/K_d , а с осью абсцисс — n . В отличие от двойных обратных координат искажения в данном случае не так велики, а экстраполяция к насыщающей концентрации позволяет более точно определить значение n . На самом деле, n может принимать только целые значения, поскольку соответствует числу центров связывания. Однако из-за разброса данных при расчетах могут получаться нецелые числа, так что приходится решать, до каких целых чисел их следует округлять.

4.2.4 Гель-фильтрация

Поскольку колоночная хроматография, в том числе и гель-фильтрация, широко применяется во всех биохимических лабораториях, для изучения связывания с помощью данного метода не требуется никакого дополнительного оборудования. Еще одно преимущество метода — его простота. Однако существуют и недостатки, а именно ограниченная точность и сравнительно большой расход реагентов. Для анализа можно использовать фирменные препараты молекулярных сит на основе декстрана, агарозы или полиакриламида. Поскольку для изучения связывания требуется лишь отделение макромолекул от низкомолекулярного лиганда, рекомендуется использовать гели, обеспечивающие высокую скорость потока, например Сефадекс G-25. В данной книге мы не останавливаемся подробно на принципах разделения при гель-фильтрации, основанных на удерживании в геле более мелких частиц, которые способны проникать в поры геля, и на более быстром прохождении через колонку более крупных частиц, которые не проникают в поры.

Самый простой способ проведения эксперимента — поместить в химический стакан смесь лиганда и макромолекул и определенное количество геля. Гель перемешивают с реакционной смесью и оставляют осаждаться до тех пор, пока слой геля не отделится от слоя прозрачного супернатанта. Отбирают аликвоту супернатанта и определяют в ней концентрацию лиганда. Для расчетов в предварительном эксперименте необходимо определить

«внешний» объем смеси ($K_{\text{внешн}}$) и «внутренний» объем ($K_{\text{внутр}}$), определяемый объемом пор геля, в которые способен проникать лиганд. Значение $K_{\text{внутр}}$ определяют по объему супернатанта после осаждения геля, к которому добавляли только раствор макромолекул в известной концентрации. Аналогичный эксперимент с раствором лиганда с известной концентрацией позволяет определить $K_{\text{внешн}} + K_{\text{внутр}}$, поскольку лиганд способен проникать в поры геля. В заключительном эксперименте с раствором, содержащим известные концентрации как макромолекул, так и лиганда, связанный с макромолекулами лиганд не проникает во внутренний объем, поэтому концентрация лиганда в супернатанте больше по сравнению с экспериментом с одним только лигандом, причем разница соответствует количеству связанного лиганда. Подобный эксперимент прост в исполнении, но точность его невысока.

Более точные результаты можно получить с помощью хроматографической колонки, заполненной тем же гелем. Следует отметить, что полное разделение частиц в соответствии с их размерами нарушает равновесие в системе, и поэтому его следует избегать. Поскольку эффективность разделения зависит от длины колонки (обычно для гель-фильтрации используют довольно длинные колонки) и объема образца (который должен быть небольшим), полного разделения можно избежать, проводя эксперимент в неоптимальных условиях разделения, а именно используя короткую колонку и большой объем образца. В таких условиях раствор лиганда и макромолекул элюируется в виде трех перекрывающихся зон. Первыми с колонки сходят макромолекулы, потерявшие ранее связанный с ними лиганд; эта фракция никакого интереса не представляет. Далее следует зона макромолекул со связанным лигандом и находящихся с ними в равновесии молекул свободного лиганда ($[A]_{\text{связ}} + [A]$). Наконец, третья зона образована свободным лигандом, который удерживался в геле в процессе элюирования. Измеряя концентрацию лиганда в этой зоне, можно найти $[A]$, а значение $[A]_{\text{связ}}$ можно найти, вычитая величину $[A]$ из общей концентрации лиганда в средней зоне.

Более сложный и более точный метод изучения связывания предложили Хуммель и Дрейер (1962). Заполненную гелем колонку уравнивают раствором лиганда с определенной концентрацией (т. е. наносят на колонку раствор лиганда, пока его концентрация на выходе из колонки не сравняется с концентрацией в наносимом растворе). Затем на колонку наносят небольшой объем макромолекул в том же растворе лиганда и продолжают элюиро-

вание. В соответствии с равновесием связывания определенное количество лиганда связывается с макромолекулами. Связанные с лигандом макромолекулы движутся через колонку быстрее, чем свободный лиганд. Количество связанного с макромолекулами лиганда по мере продвижения макромолекул через колонку все время остается постоянным, поскольку одинаковое количество лиганда диссоциирует из комплекса с макромолекулами и вновь переходит в комплекс с макромолекулами из раствора свободного лиганда с концентрацией $[A]$. Фракция макромолекул сходит с колонки в виде одного пика, концентрация лиганда в котором складывается из $[A] + [A]_{\text{связ}}$; вычитая из площади пика значение, соответствующее $[A]$, можно найти величину $[A]_{\text{связ}}$. То же значение можно определить по площади «отрицательного» пика, выходящего с колонки после выхода фракции макромолекул. Наличие этого пика объясняется тем, что некоторое количество лиганда из этой части раствора удалено в результате связывания с макромолекулами. Как и свободный лиганд, эта область со сниженной концентрацией свободного лиганда также задерживается при прохождении через колонку, в отличие от макромолекул, которые не проникают в поры геля.

Литература

- Bisswanger, H. (2002) *Enzyme Kinetics*, Wiley-VCH, Weinheim
Hummel, J.P. and Dreyer, W.J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 63, 530-532
Paulus, H. (1969) *Anal. Biochem.* 32, 91-100

4.2.5 Ультрацентрифугирование

Для выполнения данной процедуры требуется лишь препаративная ультрацентрифуга, которая обычно имеется в каждой биохимической лаборатории, так как относится к числу необходимого оборудования. Если с высокой скоростью центрифугировать раствор макромолекул и лиганда, связанные с лигандом макромолекулы опускаются вниз, а концентрацию оставшегося свободного лиганда можно определить, отобрав пробу жидкости из области мениска. При использовании центрифуг, рассчитанных на небольшой объем жидкости (например, Airfuge, TL-100; для роторов, рассчитанных на больший объем, существуют адаптеры для мелких пробирок), можно анализировать пробы объемом менее 0,1 мл. Время центрифугирования зависит как от размера макромолекул, так и от скорости вращения; время центрифугирования не должно быть слишком большим, чтобы избежать образования осадка макромолекул, поскольку при этом в системе

нарушается равновесие. Метод прост в исполнении и не требует больших затрат макромолекул, но точность его невысока.

Существует и более точный метод анализа (Chanutin et al., 1942), который можно выполнить на препаративных ультрацентрифугах обычного размера, хотя лучше использовать центрифуги для малых объемов жидкости. Принцип данной процедуры аналогичен тому, что был описан выше; отличие заключается в том, что одновременно центрифугируют несколько пробирок с различным количеством лиганда и одним и тем же количеством макромолекул. В данном случае уравнение связывания 4.1 удобно представить в виде функции общего количества лиганда:

$$[A]_0 = [A]_{\text{связ}} + [A] = \frac{n[E]_0[A]}{K_d + [A]} + [A] \quad (4.5)$$

Поскольку свободный лиганд не осаждается, его концентрацию при центрифугировании можно считать постоянной, в то время как общая концентрация лиганда $[A]_0$ и концентрация макромолекул $[E]_0$ изменяются. В соответствии с уравнением 4.5 концентрации $[A]_0$ и $[E]_0$ связаны между собой линейной зависимостью. В процессе эксперимента после центрифугирования с высокой скоростью в течение определенного времени из различных зон пробирки (мениска, средней зоны и со дна) отбирают пробы и определяют в них общую концентрацию лиганда и концентрацию макромолекул. Для каждой пробирки строят график зависимости $[A]_0$ от $[E]_0$, который должен представлять собой прямую линию. Если продлить прямую до пересечения с осью ординат, можно получить значение $[A]$. Как следует из уравнения 4.5, если построить график зависимости $1/\text{tg}$ угла наклона прямой от $1/[A]$, также получается прямая линия, экстраполяция которой до пересечения с осью ординат позволяет получить значение $1/n$, а с осью абсцисс — значение $1/K_d$:

$$\frac{1}{\text{tg угла наклона}} = \frac{K_d}{n[A]} + \frac{1}{n} \quad (4.6)$$

Существуют и другие варианты применения метода ультрацентрифугирования для изучения равновесия связывания. Хорошие результаты дает градиентный метод, особенно с использованием линейных градиентов с увеличивающейся концентрацией сахарозы (от 5% вверху до 20% на дне пробирки). Градиент сахарозы готовят до проведения центрифугирования с помощью специальных смесителей, аналогичных тем, что применяют для создания градиента при хроматографии. Смесь лиганда и макромолекул

наносят в верхнюю часть градиента и центрифугируют пробирки до тех пор, пока макромолекулы не преодолеют около двух третей пути. Далее фракции градиента анализируют на содержание лиганда и макромолекул. Зная относительное количество лиганда, связанного с макромолекулами, можно определить константу диссоциации (Draper and Hippel, 1979).

Литература

- Chanutin, A., Ludewig, S., and Masket, A.V. (1942) *J. Biol. Chem.* 143, 737-751
Draper, D.E. and Hippel, P.A. (1979) *Biochemistry* 18, 733-760

4.3 СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Спектральные методы в отличие от методов разделения молекул по размерам лишены таких недостатков, как большой расход макромолекул и низкая точность, однако возможность применения спектральных методов зависит от наличия детектируемого сигнала, определение которого зачастую сопряжено с рядом трудностей. В первую очередь необходимо изучить спектральные свойства макромолекул, а также свободного и связанного лиганда — с целью обнаружения отличий. Предпочтение отдается методам анализа в ультрафиолетовой или видимой области спектра, а также флуоресцентной спектроскопии, поскольку эти методы сравнительно просты в исполнении. Однако для изучения связывания также применяют методы кругового дихроизма или электронный парамагнитный резонанс. Если при связывании не происходит очевидных спектральных изменений макромолекулы, ее можно некоторым образом модифицировать. Большинство способов модификации макромолекул основаны на ковалентном связывании хромофорных групп, которые подают сигнал связывания лиганда. Существуют различные типы хромофоров, различающихся как собственно хромофорной частью, так и составом тех реакционных групп, которые взаимодействуют с функциональными группами белка (такими как амино-, гидроксид-, карбокси- или тиогруппы). Часто для выбора подходящей метки требуется провести целый ряд предварительных экспериментов. Реакционноспособные хромофорные молекулы обычно взаимодействуют не только с конкретной функциональной группой белка, но атакуют все доступные группы, часто вызывая неблагоприятные изменения в структуре белка, приводящие к частичной или полной денатурации или к блокированию функциональных групп активного центра. Снизить вероятность таких

нежелательных реакций до некоторой степени удастся путем сокращения времени реакции хромофора с белком. Присутствие субстратов или кофакторов может защитить функциональные центры молекулы белка.

В последующих разделах рассматриваются примеры анализа связывания с помощью дифференциальной спектроскопии (в УФ и видимой области) и флуоресцентного титрования. Эти два метода, возможно, нетипичны в данной области анализа, поскольку отличаются очень высоким уровнем сигнала по сравнению с остальными методами. Однако данные примеры полезны с точки зрения понимания принципов анализа, а для их воспроизведения подходят даже приборы, не обладающие максимально высокой чувствительностью.

4.3.1 Дифференциальная спектроскопия

Дифференциальная спектроскопия — мощный метод анализа, особенно удобный для структурных исследований белков. Очевидные преимущества метода заключаются в доступности оборудования, а также в том, что благодаря характеристическому поглощению практически любую макромолекулу можно изучать с помощью данного метода. В принципе, для проведения анализа подходит любой спектрофотометр, работающий в УФ/видимом диапазоне, однако для детекции слабых сигналов требуются чувствительные (и, следовательно, дорогие) приборы. Прибор должен быть способен сканировать и регистрировать спектры поглощения. Приборы со встроенными компьютерными системами с экраном не только облегчают процесс сканирования и наложения спектров, но также позволяют автоматически производить вычитание и сравнение спектров. Особенно удобны сканирующие диодные фотометры. Более старый прибор должен быть снабжен самописцем, напрямую соединенным с датчиком длин волн (X-Y самописец).

Для проведения дифференциальной спектроскопии необходим двухлучевой спектрофотометр. В кювету сравнения помещают все компоненты системы, кроме тех, что участвуют в реакции (в данном случае в реакции связывания), а в кювету для образца — все компоненты реакционной смеси. Прибор автоматически вычитает поглощение раствора сравнения из поглощения раствора образца, в результате чего вместо обычно довольно высоких абсолютных значений поглощения записываются лишь имеющиеся спектральные различия. Конформационные изменения в

белках, которые могут приводить к отклонениям спектральных характеристик, возникают в результате таких воздействий, как изменение pH, ионной силы, растворителя или температуры. При изучении влияния подобных факторов в кювете сравнения должен находиться белок в стандартных условиях, а условия в кювете с образцом постепенно изменяют, например, небольшими порциями добавляют кислоту или щелочь. После добавления каждой порции прописывают УФ-спектр и детектируют все происходящие сдвиги. Повышение температуры в кювете с образцом может привести к конформационным изменениям и, в конечном итоге, к денатурации белка. Денатурация представляет собой многоступенчатый процесс, а постепенное повышение температуры позволяет проанализировать его отдельные стадии и выявить те из них, на которых происходит потеря функциональной активности белка. При добавлении растворителей типа этиленгликоля, а также сахарозы происходит постепенное изменение полярности среды; взаимодействие поверхности белковой молекулы со слабополярным растворителем также может привести к конформационным изменениям, в частности, к экспонированию в раствор ранее спрятанных внутри молекулы неполярных остатков. Дифференциальная спектроскопия, кроме того, позволяет анализировать процессы связывания, поскольку лиганд может либо непосредственно взаимодействовать с функциональными группами белка, либо индуцировать его конформационные изменения.

Для интерпретации спектральных изменений следует иметь представление об особенностях белковых спектров. Поскольку большинство белков построены из 20 основных аминокислот, их спектры имеют общие черты. Различия возникают тогда, когда в составе белка полностью отсутствуют характерные аминокислоты (речь идет, главным образом, об ароматических аминокислотах), а также при связывании в белковой молекуле дополнительных компонентов, таких как кофакторы или простетические группы.

Обычный белок не поглощает свет в видимой области при длинах волн выше 320 нм, а в УФ-диапазоне можно выделить три хорошо различимые области.

- 1) В коротковолновом диапазоне ниже 200 нм поглощает свет пептидная связь. Основной вклад в спектр поглощения в данной области вносят алифатические аминокислоты, однако большое влияние на вид спектра могут оказывать и такие факторы, как присутствие ионов буфера или кислорода (по ходу светового луча или в самом образце). В связи с низкой

интенсивностью света, излучаемого ультрафиолетовыми лампами, эта дальняя УФ-область практически недоступна для анализа с помощью большинства приборов.

- 2) В диапазоне от 200 до 230 нм основной вклад в спектр поглощения вносят ароматические аминокислоты (фенилаланин — 206 нм, тирозин — 224 нм и триптофан — 219 нм); кроме того, определенный вклад вносят гистидин (211 нм), серосодержащие аминокислоты, аргинин и элементы вторичной структуры белка, такие как α -спирали и β -слои.
- 3) В диапазоне от 260 до 300 нм проявляется поглощение трех ароматических аминокислот. Основной вклад вносит триптофан, имеющий максимум поглощения при 280 нм, и поэтому чаще всего максимум поглощения белков расположен именно на этой длине волны. Тирозин имеет максимум поглощения при 274,6 нм, причем интенсивность его поглощения несколько ниже. Фенилаланин поглощает очень слабо (максимум поглощения при 257 нм), так что его вклад практически не учитывают. Интенсивности поглощения трех ароматических аминокислот соотносятся следующим образом: Phe:Tyр:Trp = 1:7,2:28,4. В данном диапазоне длин волн поглощение всех трех ароматических аминокислот слабее, чем в коротковолновой области.

Можно было бы предположить, что спектр белка легко предсказать путем суммирования спектров составляющих его аминокислот, определенных с помощью аминокислотного анализа. Однако это не так, поскольку, как мы помним, в нативном белке некоторые аминокислоты находятся в глубине молекулы и их поглощение учитывать не следует.

В коротковолновой области между 200 и 230 нм можно наблюдать за конформационными и изменениями, происходящими в белке, особенно если они затрагивают вторичную структуру белка. Однако, поскольку на вид спектра в этом диапазоне длин волн влияет множество других факторов, детектировать здесь небольшие изменения довольно сложно. Для анализа белков (например, для определения их концентрации, см. разд. 3.8.1) и спектральных изменений больше подходит пик, расположенный в более длинноволновой области (при 280 нм), хотя он имеет меньшую интенсивность. Предпочтение отдается этой области спектра в связи с тем, что сигналы здесь более специфичны и могут быть напрямую соотнесены с определенными аминокислотами. Спектральные изменения могут сопровождать любое взаимодействие, например, связывание лиганда в непосредственной близости от

таких аминокислот, возможно, происходящее с образованием комплекса с переносом заряда, либо просто изменение полярности вблизи этих аминокислот. В любом случае происходящие изменения относительно слабые.

Для проведения дифференциальной спектроскопии, особенно в тех случаях, когда определяют характеристики равновесия связывания, одинаковое (и обычно довольно большое) количество макромолекул, претерпевающих оптические изменения при связывании лиганда, помещают в кювету для образца и в кювету сравнения. Прибор определяет различие между раствором сравнения и образцом и прописывает базовую линию, даже при высоких абсолютных значениях поглощения в кюветах. При добавлении лиганда в кювету с образцом происходят спектральные изменения и прибор регистрирует дифференциальный спектр. Однако следует учитывать, что сам лиганд также может поглощать свет в данном диапазоне длин волн, что вносит вклад в вид спектра и мешает анализу связывания. Для учета вклада поглощения лиганда используют комбинированные кюветы, имеющие два отсека, разделенные стеклянной перегородкой. Такие кюветы используют как для образца, так и для раствора сравнения. Сначала в один из отсеков кюветы для образца и кюветы сравнения помещают раствор макромолекул, а в другой — буферный раствор. Затем лиганд добавляют в тот отсек кюветы для образца, что содержит раствор макромолекул, и в тот отсек кюветы сравнения, что содержит буфер. В результате на пути светового луча оказываются и раствор макромолекул, и раствор лиганда, так что абсолютные поглощения обоих растворов вычитаются из поглощения реакционной смеси. Связывание происходит только в кювете для образца, что позволяет без помех регистрировать дифференциальный спектр. Раствор лиганда добавляют к раствору макромолекул постепенно, пока не будет достигнуто насыщение.

Метод дифференциальной спектроскопии отличается очень высокой чувствительностью, но для получения надежных результатов требуется довольно большой опыт работы. Основная проблема связана с определением небольших изменений на фоне высокого абсолютного значения поглощения; кроме того, даже слабые воздействия могут изменять вид дифференциального спектра. Поскольку для проведения эксперимента требуются высокие концентрации реагентов, даже незначительные флуктуации могут оказывать серьезное воздействие. Следует помнить, что последовательное добавление даже небольших порций лиганда приводит к изменению концентрации макромолекул. Следова-

тельно, раствор макромолекул в кювете сравнения следует разбавлять аналогичным образом, добавляя туда соответствующие порции буфера.

4.3.1.1 ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ АНАЛИЗА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С КАТАЛАЗОЙ

В качестве примера рассмотрим связывание ингибиторов с ферментом каталазой. На этом же примере объясним суть фотометрического титрования. Рассмотрим два типа лигандов: цианид, при связывании которого происходят драматические изменения дифференциального спектра, и фторид, связывание которого приводит к менее серьезным последствиям, что отражает более реальную экспериментальную ситуацию. В качестве макромолекулы в эксперименте используется каталаза — недорогой фермент, доступный в больших количествах.

Каталаза состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой 60 000, каждая из которых содержит железо в порфириновом кольце. Четыре из шести координационных связей железа соединяют его с порфирином, одна связь направлена на остаток гистидина в молекуле белка, а шестая связь образуется при взаимодействии с субстратом. Именно эта связь может быть заблокирована ингибитором типа цианида или фторида. При связывании система порфиринового кольца переходит из высокоспинового в низкоспиновое состояние, а железо перемещается в плоскость порфиринового кольца. Это перемещение приводит к сильному батохромному сдвигу, который и наблюдают в эксперименте. Кроме того, изучают зависимость константы равновесия реакции от температуры, описываемую уравнением Вант-Гоффа:

$$\left(\frac{d \ln K_d}{dT} \right)_p = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4.7)$$

где T — абсолютная температура (в кельвинах), H — энтальпия реакции, а R — универсальная газовая постоянная. Давление P должно оставаться постоянным. Интегрирование этого уравнения при условии независимости ΔH от температуры в небольшом температурном диапазоне приводит к следующему уравнению:

$$\ln K_d = \frac{\Delta H}{RT} + C \quad (4.8)$$

Здесь C — постоянная интегрирования. График зависимости $\ln A'd$ от $1/T$ должен представлять собой прямую линию, по наклону которой можно вычислить изменение энтальпии реакции. Сравните температурную зависимость константы диссоциации, описываемую уравнением Вант-Гоффа, с температурной зависимостью каталитической константы ферментативной реакции, описываемой эмпирическим уравнением Аррениуса, из которого можно определить значение энергии активации.

Необходимые реагенты и растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

Каталаза из печени быка, фирменный запасной раствор с концентрацией около 20 мг/мл. Если используется кристаллическая каталаза, необходимо удостовериться в том, что в момент отбора пробы фермента кристаллы находятся в виде суспензии. Кристаллы необходимо полностью растворить (например, при 40-кратном разбавлении) в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5; при наличии некоторой мутности раствор следует очистить центрифугированием. Для определения реальной концентрации белка используют коэффициент поглощения $\epsilon_{405} = 38 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

0,1 М цианид калия (KCN, M_2 65,1; 65 мг в 10 мл), свежеприготовленный раствор. Вещество чрезвычайно токсично! Раствор цианида летуч, хранить его нужно в плотно закрытой емкости; при титровании кювету накрывать.

0,5 М фторид натрия (NaF, M_2 42; 215 мг в 10 мл)

Оборудование

Записывающий двухлучевой фотометр, действующий в УФ/видимой области спектра

Двойные кюветы (желательно)

Кварцевые кюветы

Шприц для отбора проб объемом несколько микролитров

Снятие спектра фермента

В предварительном эксперименте следует изучить спектральные характеристики фермента. Фермент разбавляют 0,1 М фосфатом калия, pH 7,5, до концентрации 0,5 мг/мл и снимают спектр в диапазоне длин волн от 200 до 650 нм в кварцевых кюветках, используя в качестве раствора сравнения 0,1 М фосфат калия, pH 7,5. Затем анализируют спектральные изменения, происходящие при последовательном добавлении

трех аликвот лиганда (цианида калия), каждый раз прописывая спектр раствора. Все спектры следует наложить друг на друга, чтобы наблюдать сдвиг в области порфиринового кольца. При первом добавлении следует выбрать концентрацию цианида, близкую к KJ_2 (считая $A''_d = 1 \cdot 10^{-6}$ М). Для второго добавления концентрацию цианида выбирают в области полунасыщения ($3 \cdot A^{\wedge}$; вспомните, что насыщение относится к концентрации свободного лиганда, а значительная часть лиганда оказалась связанной), а для последнего добавления — в области полного насыщения ($50 \cdot AT_d$). В заключительной стадии эксперимента буферный раствор в кювете сравнения заменяют раствором фермента (без цианида). Теперь дифференциальный спектр становится виден.

В первом спектре, снятом без добавления лиганда, видны три основных пика: самый большой при 210 нм, второй при 280 нм и третий при 405 нм. Два первых пика — это главным образом пики белка (вклад порфиринового кольца невелик), тогда как пик в видимой области полностью определяется наличием порфиринового кольца. Именно в этой области при добавлении цианида происходят наиболее сильные изменения, и появляется характерный дифференциальный спектр. Его положение и интенсивность указывают диапазон для последующего титрования. Дифференциальный спектр (соответствующий первичному изменению исходного пика) имеет как положительный, так и отрицательный максимумы. Поэтому при последующем титровании базовую линию прибора следует разместить на середине экрана или дисплея.

Титрование осуществляют путем последовательного добавления лиганда. После добавления каждой порции прописывают дифференциальный спектр. Поскольку дифференциальный спектр ограничен только видимой областью, для проведения измерений нужны лишь стеклянные кюветы.

Фотометрическое титрование с помощью цианида калия

Вообще говоря, для фотометрического титрования нужны двойные кюветы, при этом раствор макромолекул в одинаковых концентрациях помещают в одни и те же отсеки (например, в правые) кюветы для образца и кюветы сравнения, а другие отсеки заполняют буфером. Прибор должен изобразить линейную базовую линию. Значительные отклонения от линейности указывают на различие концентраций, размеров кювет или

путей двух лучей. Титрование осуществляется путем последовательного добавления порций лиганда в отсек с раствором макромолекул в кювете для образца и в отсек с буфером в кювете сравнения. Поскольку в данном конкретном эксперименте лиганд не поглощает в области дифференциального спектра, нет необходимости учитывать его поглощение. Таким образом, не нужно добавлять лиганд в раствор сравнения и двойные кюветы не требуются. Чтобы избежать различия концентраций раствора образца и раствора сравнения, каталазу не следует разбавлять прямо в кюветах, а лучше добавлять ее в кювету для образца и в кювету сравнения уже в одинаковом разведении.

После получения стабильной базовой линии можно начинать титрование, последовательно добавляя порции цианида в кювету с образцом. Поскольку для получения полной кривой связывания в одну и ту же кювету для образца лиганд добавляют 25-30 раз, в этой кювете происходит значительное увеличение объема раствора и разбавление белка. Чтобы компенсировать возникающее различие, в кювету сравнения последовательно добавляют такие же объемы буфера. Тем не менее, степень разбавления раствора следует по возможности минимизировать. Например, если объем реакционной смеси составляет 3 мл, то добавление 30 порций лиганда по 10 мкл (всего 300 мкл) приведет к увеличению объема на 10%, что недопустимо. Поэтому объем порции лиганда должен составлять 1 мкл, тогда суммарное изменение объема составит всего 1%. Запасной раствор лиганда следует разбавить соответствующим образом, а для его внесения лучше использовать шприц на несколько микролитров, который гораздо точнее, чем автоматическая пипетка.

Следует также внимательно отнестись к перемешиванию жидкости в кюветах после добавления реагентов. Если возможно, лучше использовать маленькие магнитные мешалки. Худший способ перемешивания — вынуть кювету из кюветного отделения и перемешать содержимое, поскольку поставить кювету обратно точно так, как она стояла до того, практически невозможно. Для перемешивания можно воспользоваться маленькой пластиковой палочкой; на эту же палочку можно помещать и каплю раствора лиганда, поскольку наконечник шприца или пипетки нельзя непосредственно опускать в раствор и использовать для перемешивания. Однако следует учесть, что вместе с палочкой, вынимаемой из раствора после

перемешивания несколько десятков раз, удаляется значительная часть жидкости из кюветы. Чтобы этого избежать, не нужно вытирать палочку каждый раз после перемешивания, а следует класть ее таким образом, чтобы опускаемая в раствор часть палочки не касалась никаких поверхностей, а находилась на воздухе. Для перемешивания образца и раствора сравнения необходимо использовать две разные палочки, поскольку смешение этих двух растворов недопустимо.

После добавления каждой порции лиганда прописывают полный дифференциальный спектр, достигая области, в которой уже не происходит поглощения. Это нужно для получения базовой линии при построении кривой связывания, поскольку базовая линия прибора может слегка изменяться в процессе титрования, например, из-за дрейфа или флуктуаций интенсивности света от источника. При наложении спектров следует уделять внимание их точной нумерации для последующего построения кривой.

Ход титрования

Хотя насыщение при связывании лиганда подчиняется общим закономерностям, которые аналогичны тем, что описываются уравнением Михаэлиса-Ментен, у фотометрического титрования есть свои особенности. Кривая насыщения — это первичный график, построенный на основании данных титрования в координатах дифференциальный сигнал/концентрация добавленного лиганда $[A]_0$. Однако этот график не является гиперболической функцией, чем отличается от обычных кривых связывания (см. уравнение 4.1), и его трудно линеаризовать, чтобы получить константы. Для анализа такой закономерности требуется множество дополнительных данных. До начала эксперимента следует найти диапазон оптимальных концентраций лиганда. На кривой титрования можно выделить три основных участка.

- 1) В области низких концентраций лиганда (приблизительно до одной трети насыщения) кривая возрастает почти линейным образом. Касательная к кривой на данном участке должна проходить через начало координат. В данном диапазоне концентраций следует получить не менее 10-15 экспериментальных точек, желательно вблизи начала координат, поскольку неверное проведение касательной значительно влияет на качество результатов. Наименьшая концентрация лиганда должна быть в 50-100 раз ниже кон-

станты диссоциации, а последующие концентрации должны возрасти через небольшие интервалы. Поскольку в данном эксперименте $K_{\text{д}} = 10^6 \text{ М}$, первое добавление 1 мкл лиганда в 3 мл раствора каталазы должно создать концентрацию лиганда $2 \cdot 10^{-8} \text{ М}$. Для этого исходная концентрация раствора лиганда должна составлять $6 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. После пяти последовательных добавлений по 1 мкл лиганда в кювете достигается концентрация 10^{-7} М . Далее для более быстрого продвижения к области более высоких концентраций можно использовать раствор лиганда с концентрацией $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. После десяти последовательных добавлений лиганда его концентрация в кювете составляет $5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, что соответствует $1/3$ насыщения.

- 2) На среднем участке кривой происходит значительное отклонение от линейности, причем изгиб кривой соответствует константе диссоциации. На этом участке следует получить около 10 точек. Первые пять точек получают с помощью раствора лиганда с концентрацией $3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, достигая в кювете концентрации 10^{-6} М , а следующие пять — с помощью раствора с концентрацией $3 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, достигая полунасыщения ($5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$).
- 3) Экстраполяцию кривой к полному насыщению осуществить не так просто, как это делается при анализе ферментативной кинетики, поэтому титрование необходимо продолжать до тех пор, пока насыщение не будет достигнуто. Достижение насыщения можно констатировать, накладывая друг на друга последовательно получаемые дифференциальные спектры. Если при наложении двух последовательных спектров между ними не обнаруживается различий, титрование следует продолжать далее, пока не совпадут четыре или пять последовательных спектров; только тогда можно быть уверенным в достижении насыщения. Если пять раз добавлять по 1 мкл лиганда с концентрацией $3 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, а затем пять раз по 1 мкл лиганда с концентрацией $6 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, можно достичь насыщения ($1,1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$).

Если провести аналогичные эксперименты при различных температурах, то по уравнению Вант-Гоффа можно вычислить энтальпию реакции. Следует провести эксперимент как минимум при трех значениях температуры (15, 25 и 35 °С), учитывая, что большое количество экспериментальных точек на каждой кривой обеспечит достоверность значений константы диссоциации

для каждой температуры. При выборе диапазона концентраций лиганда следует учесть, что сродство лиганда к макромолекуле снижается по мере роста K_{ii} с увеличением температуры.

Аналогичным образом можно провести титрование каталазы раствором фторида натрия (только при 25 °С). Для этого лиганда рабочий диапазон концентраций должен быть в 10 раз выше, поскольку связывание в данном случае более слабое, а концентрацию каталазы следует увеличить до 2-5 мг/мл (в зависимости от чувствительности фотометра).

4.3.1.2 АНАЛИЗ КРИВОЙ СВЯЗЫВАНИЯ, ПОЛУЧЕННОЙ СПЕКТРАЛЬНЫМ МЕТОДОМ

Кривую титрования строят как график зависимости поглощения в определенной точке дифференциального спектра по сравнению с участком того же спектра, в котором нет поглощения, от общей концентрации лиганда $[A]_0$ в кювете. Если дифференциальный спектр является результатом одного типа связывания, для построения графика можно выбрать любую длину волны, однако лучше выбрать ту длину волны, на которой регистрируются наибольшие изменения. В приведенном выше эксперименте для построения графика можно использовать длину волны как отрицательного, так и положительного максимума. При построении графика нужно использовать значение поглощения при одной и той же длине волны, даже если происходит сдвиг максимума (в описываемом эксперименте такого сдвига не наблюдается).

Кривая титрования должна иметь вид стандартной кривой с насыщением. Как уже говорилось выше, касательная к кривой в начальном участке должна проходить через начало координат. В этой области низких концентраций лиганда происходит практически количественное связывание молекул лиганда и макромолекул, так что касательная к кривой на этом участке отражает ход связывания: $[A]_0$ и $[A]_{\text{связ}} \ll [A]$. При дальнейшем увеличении концентрации лиганда уже *не весь* лиганд связывается с макромолекулами, так что $[A]_0$ распределяется между $[A]$ и $[A]_{\text{связ}}$. Хотя расстояние между осью ординат и касательной в любой точке всегда равно $[A]_{\text{связ}}$, расстояние от касательной до кривой титрования как измеряемой величины составляет $[A]$, а оба участка вместе составляют $[A]_0$. Поэтому, зная общее количество добавленного в кювету лиганда, можно рассчитать количество свободного и связанного лиганда, а на основании этих данных можно построить кривую связывания в соответствии с общим

уравнением связывания (см. разд. 4.2.3) в нелинеаризованной или линеаризованной форме (в координатах Скэтчарда или в двойных обратных координатах) и найти константы связывания. Число центров связывания на макромолекуле можно найти, проводя к оси абсцисс перпендикуляр из точки пересечения первой касательной с асимптотой кривой при насыщении; эта точка соответствует значению $[E]_0$, поэтому для определения n следует определить точную концентрацию каталазы в кювете при 405 нм (см. выше).

Из приведенного выше обсуждения становится понятно, что кривую титрования нельзя рассматривать и обрабатывать как экспериментальную кривую связывания, учитывая преобладающее количество связанного лиганда. Тем не менее, метод касательных для обсчета кривой титрования также не безупречен. Из значений в области малых концентраций, использующихся для построения первой касательной, нельзя найти концентрацию свободного лиганда, и эти значения не используются при построении графика в координатах Скэтчарда. Значительные ошибки могут возникать в результате неправильного проведения касательных, из-за разброса данных, низкого сродства связывания или недостаточного количества макромолекул. В частности, последний фактор может стать причиной ошибок в рассматриваемом эксперименте, поскольку, благодаря достаточно сильному сигналу, используется сравнительно низкая концентрация каталазы. В таких условиях определенное количество свободного лиганда присутствует в смеси даже в области низких концентраций лиганда, так что касательную на этом участке можно ошибочно провести под слишком малым углом.

Кривую титрования можно привести к линейному виду с помощью уравнения Стокелла (1959):

$$\frac{[A]_0}{[E]_0 Y} = \frac{K_d}{[E]_0 (1 - Y)} + n \quad (4.9)$$

Для этого значения $[A]_0/[E]_0 Y$ откладывают против значений $1/([E]_0(1 - Y))$. Функцию насыщения находят путем умножения измеряемого значения поглощения на постоянный коэффициент, причем поглощение при насыщении составляет единицу (коэффициент = 1/поглощение). По такой схеме можно использовать значение $[A]_0$ непосредственно, без необходимости определять отдельно концентрацию свободного и связанного лиганда. Следует учитывать, что данный график очень чувствителен к точности определения уровня насыщения.

Литература

- Donovan, J.W. (1973) *Meth. Enzymol.* 27, 497-525
Herskowitz, T.T. (1967) *Meth. Enzymol.* 11, 748-775
Stockell, A. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1286-1292
Wettlaufer, D.B. (1962) *Adv. Prot. Chem.* 17, 303-390

4.3.2 Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресцентному анализу часто отдают предпочтение перед методом абсорбционной спектроскопии, поскольку происходящие при флуоресценции спектральные изменения обычно более сильно выражены. Метод примерно в 100 раз чувствительнее спектроскопии в УФ/видимом диапазоне, что позволяет получать более четкие результаты и снизить расход образцов, в частности макромолекул. Данные преимущества «компенсируются» такими недостатками, как более высокая стоимость оборудования и более высокая чувствительность к различным мешающим факторам. Флуоресценция очень сильно зависит от полярности среды, которая может меняться при взаимодействии лиганда с хромофором в центре связывания или в непосредственной близости от него. В отличие от довольно значительного влияния самого белка, кофакторов или метаболитов на спектр поглощения, на флуоресценцию они практически не оказывают воздействия. Три ароматические аминокислоты излучают свет, однако вклад фенилаланина настолько мал, что его трудно даже зарегистрировать. Квантовый выход флуоресценции тирозина в виде свободной аминокислоты составляет 20%; однако в белках имеет место тушение его флуоресценции. Флуоресценция свободного триптофана имеет такой же квантовый выход, но в белках его излучение доминирует над излучением тирозина. В любом белке, в молекуле которого есть эта аминокислота, можно обнаружить флуоресценцию триптофана, но из-за узкого спектрального диапазона (возбуждение при 280 нм, испускание между 330 и 350 нм) она не регистрируется глазом и поэтому о ее существовании часто не подозревают. Среди природных кофакторов белков флуоресцентными свойствами обладают, в частности, флавины и НАД(Ф)Н. Если природные хромофоры не позволяют зарегистрировать какие-либо спектральные изменения, в белки вводят искусственные флуоресцентные маркеры. Для проведения анализа используют либо непосредственное превращение лиганда во флуоресцентное вещество, например, в е-АТФ (аналог АТФ),

либо к белку в качестве метки присоединяют флуорофоры типа флуоресцеинизотиоцианата.

Как правило, флуорофор должен возбуждаться поглощаемым светом, а испускать свет с большей длиной волны. Поэтому более сложные флуориметры позволяют прописывать как спектры поглощения, так и спектры испускания. С помощью таких приборов можно выбрать оптимальные экспериментальные условия. Сначала, используя постоянную длину волны поглощения, определяют максимум флуоресценции при более высоких длинах волн. Затем при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции, анализируют спектр возбуждения в более коротковолновой области, поскольку максимум возбуждения может несколько отличаться от пика поглощения, что связано с неравномерным распределением интенсивности излучения источника возбуждающего света. Кроме того, следует учесть влияние и других факторов, таких как рассеяние света, которое обычно происходит при совпадении длин волн возбуждения и испускания, рассеяние света на стенках кюветы, рассеяние из-за присутствия частичек пыли в растворе, а также релеевское рассеяние в результате взаимодействий фотонов с молекулами в растворе. При высокой чувствительности анализа можно наблюдать пики рамановских спектров, располагающиеся на определенном расстоянии по обе стороны от максимума возбуждения. Эти небольшие симметричные пики можно наблюдать в растворе в отсутствие хромофора. Такие пики легко идентифицировать, поскольку при изменении длины волны возбуждающего света они перемещаются в том же направлении, в то время как максимум флуоресценции не сдвигается. Это следует учитывать, чтобы не допустить перекрытия пиков рамановского спектра с максимумом флуоресценции. Для возбуждения флуорофора подходит свет с любой длиной волны в пределах его спектра поглощения, однако следует учитывать, что интенсивность испускаемого света коррелирует с интенсивностью поглощаемого света, так что наибольшая интенсивность испускания может быть достигнута только при облучении светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения.

Интенсивность испускаемого света зависит от целого ряда факторов, таких как интенсивность источника света, длина оптического пути, размеры кюветы и чувствительность фотоумножителя, так что измерения, выполненные на различных приборах, невозможно сравнивать между собой напрямую, как в случае

измерения поглощения. Следовательно, в результате измерений получают только относительные значения флуоресценции, которых, впрочем, вполне достаточно для решения большинства задач. Для определения абсолютных значений флуоресценции необходимо использовать стандартные вещества, например сульфат хинина.

Еще одним фактором, усложняющим проведение флуоресцентного анализа, является тушение флуоресценции. Находящиеся в растворе примеси и кислород значительно понижают интенсивность флуоресценции. Поэтому чистоте раствора следует уделять особое внимание, а кислород перед проведением измерений необходимо удалять, например с помощью вакуума. Тушение может вызывать сам флуорофор, находящийся в высокой концентрации. Обычно интенсивность флуоресценции линейно возрастает с увеличением концентрации флуорофора, однако при высоких концентрациях могут наблюдаться отклонения от линейности. В таких условиях количественный анализ невозможен. Наконец, интенсивность флуоресценции сильно зависит от температуры: при повышении температуры квантовый выход флуоресценции падает.

Все перечисленные выше факторы усложняют проведение анализа, поэтому для получения надежных результатов необходим определенный опыт. Тем не менее, неоспоримым преимуществом метода является возможность получения интенсивного сигнала. Тот факт, что лишь немногие вещества способны флуоресцировать, имеет положительное значение, поскольку это позволяет проводить селективный анализ и легко соотносить сигнал с конкретной группой или хромофором. При снижении полярности среды для многих флуорофоров наблюдается выраженное фиолетовое смещение, часто сопровождающееся повышением интенсивности сигнала. Это может указывать на наличие связывания, поскольку многие центры связывания образованы неполярными аминокислотными остатками. Яркий пример представлен ниже. Анилинонафталин-8-сульфонат (АНС) — гидрофобный хромофор, прочно связывающийся с неполярными участками молекул, такими как гемовый карман гемоглобина или гидрофобные центры связывания сывороточного альбумина. В воде АНС демонстрирует лишь слабое флуоресцентное излучение, которое сильно увеличивается и сопровождается гипсохромным сдвигом при переходе к неполярной среде; это явление можно наблюдать при растворении АНС в длинноцепочечных спиртах.

4.3.2.1 СВЯЗЫВАНИЕ АНС С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Данный эксперимент демонстрирует высокую интенсивность сигнала АНС и сдвиг максимума его флуоресценции в область более коротких волн. Сигнал флуоресценции настолько сильный, что может быть зарегистрирован с помощью любого обычного спектрофлуориметра. В данном случае описана процедура выполнения эксперимента на приборе, способном описывать как спектр испускания, так и спектр возбуждения, хотя можно использовать прибор, позволяющий снимать только спектр испускания.

Необходимые реагенты и растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

0,1 мМ бычий сывороточный альбумин (БСА; M_m 68 000; 68 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5)

10 мМ анилинафталин-8-сульфонат в воде (АНС, аммонийная соль; M : 316,4; 31,6 мг в 10 мл воды)

10 мМ анилинафталин-8-сульфонат в этиловом спирте (31,6 мг в 10 мл этанола)

Спирты (справа указана диэлектрическая проницаемость ϵ_r)

вода	80,18
этиленгликоль	37,7
метанол	32,6
этанол	24,3
н-пропанол	20,1
изопропанол	18,3
н-бутанол	17,7
изобутанол	17,1
н-гексанол	13,9
н-октанол	10,3

Необходимое оборудование

Записывающий спектрофлуориметр

Стеклообразные и кварцевые кюветы для измерения флуоресценции

Шприц для отбора жидкости объемом несколько микролитров (для АНС, не для белка)

Общие замечания

Измерения флуоресценции требуют высочайшей точности; присутствие любой примеси или пыли в анализируемом растворе недопустимо. Кюветы следует брать в перчатках; тех

поверхностей кюветы, через которые проходит свет, не следует касаться вовсе. Все растворы, за исключением раствора белка и спиртов, следует пропустить через стерильные фильтры для удаления частичек пыли. Пыль и пузырьки воздуха в кювете являются серьезными помехами, которые вызывают сдвиг спектра или появление кажущегося максимума флуоресценции. Если в процессе проведения эксперимента, например, при титровании, происходят неожиданные явления, раствор в кювете следует перемешать, не производя больше никаких изменений. После перемешивания поведение системы должно измениться или нормализоваться. Кюветы в кюветном отделении всегда должны размещаться одним и тем же образом.

Спектр флуоресценции

В данном эксперименте снимают спектры возбуждения и испускания раствора БСА с концентрацией $2 \cdot 10^{-6}$ М в 0,1 М фосфате калия, рН 7,5, и раствора АНС с концентрацией $1 \cdot 10^{-7}$ М в этаноле. Для белка длину волны возбуждения следует установить на уровне 280 нм (используйте кварцевые кюветы!) и прописывать спектр испускания в более длинноволновой области. При сканировании всегда следует отступить примерно на 10 нм от интенсивного пика при длине волны возбуждения. Максимум пика испускания триптофана, обычно находящийся при длине волны 350 нм, в белках смещается в область более коротких волн. В свою очередь максимум пика испускания можно использовать для определения спектра возбуждения во всем УФ-диапазоне; при этом сканирование прекращают примерно на 10 нм ниже длины волны испускания. Необходимо зарегистрировать максимумы двух пиков; обратите внимание, что пик в более коротковолновой области имеет меньшую интенсивность, чем пик при 280 нм, в отличие от УФ спектра белка (см. пример с каталазой в разд. 4.3.1.1). Это искусственное искажение возникает из-за слабого излучения в дальней УФ-области ксеноновой лампы, которая установлена в большинстве типов спектрофотометров. В некоторых приборах данное явление автоматически корректируется.

Аналогичным образом получают спектры АНС в этаноле при возбуждении светом с длиной волны 366 нм и с максимумом испускания в области 480 нм. Для снятия этого спектра и в дальнейшем анализе используют стеклянные кюветы.

Зависимость интенсивности и расположения максимума испускания ЛИС от полярности среды

При снижении полярности среды максимум испускания АНС сдвигается в область более коротких волн, а интенсивность пика испускания увеличивается. Это можно продемонстрировать, если снимать спектр испускания АНС в спиртах с различной длиной углеродной цепи. Готовят растворы АНС с конечной концентрацией 10^{-7} М в приведенной выше серии спиртов. Для приготовления растворов в высших спиртах следует использовать 10 мМ запасной раствор АНС в этиловом спирте, а для приготовления растворов в воде, этиленгликоле и метаноле используют водный запасной раствор. При постоянной длине волны возбуждения (определенный выше максимум возбуждения при 366 нм) прописывают спектр испускания каждого раствора. Если спектр АНС в воде зарегистрировать не удастся, следует увеличить концентрацию АНС как минимум в 10 раз (до 10^{-6} М). Строят графики зависимости длины волны максимума испускания и относительной интенсивности флуоресценции от диэлектрической проницаемости среды.

Калибровочная кривая для АНС

С помощью данного эксперимента можно найти нижний предел обнаружения для данного прибора и диапазон линейной зависимости между флуоресценцией и концентрацией флуорофора. Водный раствор АНС (здесь и далее используют только 10 мМ запасной раствор АНС в воде и избегают любых примесей этанола или других спиртов) разбавляют до такой степени, чтобы пик испускания был едва различим (например, 10^{-7} М; эта концентрация в каждом конкретном случае определяется чувствительностью прибора). Начиная от этого уровня, концентрацию АНС постепенно увеличивают, описывая каждый раз спектр испускания. Относительная интенсивность флуоресценции в максимуме должна линейно увеличиваться с увеличением концентрации (можно построить график). При высоких концентрациях АНС (около $5 \cdot 10^{-5}$ М) в результате концентрационного тушения флуоресценции начинают наблюдаться отклонения от линейной зависимости. Здесь заканчивается линейный диапазон измерений.

Кривая титрования с БСА

Фотометрическое титрование обычно осуществляют путем повышения концентрации лиганда при постоянной кон-

центрации макромолекул. Описанный ниже эксперимент выполнен в другом режиме — при переменной концентрации БСА и постоянной концентрации лиганда. При равновесии оба компонента можно считать равноправными, так что общее уравнение связывания можно представить в таком виде, что переменной будет являться концентрация макромолекул. Обычно этого не делают, например, если макромолекула имеет больше одного сайта связывания лиганда (в данном случае это не так); кроме того, не всегда удастся приготовить раствор макромолекул с высокой концентрацией, так что насыщение оказывается недостижимым. Однако в нашем примере подобная постановка эксперимента имеет некоторые преимущества, поэтому мы приводим два варианта метода, в которых по очереди варьируют концентрацию каждого из двух компонентов. Следят за увеличением интенсивности флуоресценции при связывании АНС с неполярным центром связывания на молекуле БСА. При постоянной концентрации АНС в кювете (например, $1 \cdot 10^{-8}$ М) сначала, при отсутствии макромолекул, можно зарегистрировать лишь очень слабый пик флуоресценции (возбуждения и испускания, см. выше). При постепенном увеличении концентрации БСА интенсивность флуоресценции значительно возрастает, что сопровождается сдвигом максимума в фиолетовую область. Это увеличение продолжается до достижения насыщения, поскольку в таких условиях происходит лишь регистрация флуоресценции АНС, а сам по себе БСА никакого вклада во флуоресценцию не вносит. Поскольку в ходе эксперимента концентрация флуорофора остается постоянной, наблюдаемые изменения флуоресценции отражают течение процесса связывания, на которое никакие другие факторы (кроме артефактов) влияния не оказывают.

До проведения полного эксперимента по титрованию необходимы предварительные измерения в области небольших концентраций компонентов. Важно правильно выбрать концентрацию компонента, которая остается постоянной (в данном случае концентрацию АНС), поскольку именно лимитирующая концентрация этого компонента определяет уровень насыщения. Эта концентрация не должна быть слишком высокой, поскольку в противном случае концентрация второго компонента, необходимая для достижения насыщения, может оказаться настолько высокой, что возникнет эффект тушения флуоресценции. С другой стороны, при слишком низкой кон-

центрации постоянного компонента уровень флуоресценции может быть настолько низким, что не позволит производить достоверных измерений (этот уровень определяется чувствительностью прибора).

Степень усиления флуоресценции в результате связывания флуорофора с неполярным центром на молекуле БСА определяют по отношению интенсивности флуоресценции при насыщении к интенсивности флуоресценции исходного раствора лиганда (АНС) в кювете до добавления БСА. Из графиков, построенных на основании экспериментов с различными спиртами, можно оценить диэлектрическую проницаемость неполярного центра связывания. Как и в описанном выше эксперименте по получению дифференциального спектра (разд. 4.3.1.1), можно построить кривую титрования. Приведенные в этом разделе рассуждения относительно выбора диапазона изменяемых концентраций компонента справедливы и в данном случае. Следует учесть необходимость равномерного перемешивания раствора после каждого добавления реагента, о чем также говорилось выше. После каждого добавления БСА прописывают спектр испускания. В данном эксперименте максимум флуоресценции АНС сдвигается в область более коротких волн, а интенсивность флуоресценции увеличивается. Для расчетов используют только изменение интенсивности флуоресценции, поскольку именно она отражает количество связанного АНС. Следовательно, для расчета кривой титрования следует использовать не сдвиг максимума, а интенсивность флуоресценции при выбранной длине волны, соответствующую образованию комплекса АНС-БСА, т.е. максимум флуоресценции при достижении насыщения.

Кривая титрования с АНС

Титрование раствора БСА раствором лиганда (АНС) имеет тот недостаток, что в увеличение интенсивности флуоресценции вносят вклад два фактора: процесс связывания и собственная флуоресценция АНС. В дифференциальной спектроскопии подобные эффекты можно учесть с помощью двухлучевой системы анализа и двойных кювет (см. разд. 4.3.1). Двойные кюветы во флуоресцентном анализе применять невозможно, а вот двухлучевую систему в принципе можно использовать. Однако из-за специфических проблем флуоресцентного анализа, строгих требований к световому пути и различных мешающих факторов применение двухлучевой системы во

флуоресцентном анализе все же не рекомендуется. Постоянная концентрация БСА в данном эксперименте может быть такой же, какой была постоянная концентрация АНС в предыдущем эксперименте, поскольку при наличии в макромолекуле лишь одного центра связывания уровень насыщения определяется веществом в постоянной концентрации. Это правило действует и в данном эксперименте, хотя при высоких концентрациях АНС имеет место неспецифическое связывание.

При низких концентрациях АНС собственная флуоресценция АНС ничтожна мала по сравнению с той, которая возникает в результате связывания, однако при высоких концентрациях лиганда свободный АНС вносит довольно серьезный вклад в суммарную флуоресценцию, что может затруднить определение уровня насыщения (не следует путать концентрационное тушение флуоресценции с достижением насыщения). Собственную флуоресценцию АНС можно учесть, используя калибровочную кривую, построенную для свободного АНС. При этом следует пользоваться значениями интенсивности флуоресценции на длине волны максимума для связанного, а не для свободного АНС.

Для анализа кривых титрования применяют подход, который был описан выше в разделе, посвященном дифференциальной спектроскопии; для линеаризации также можно применить метод Стокелла.

Литература

- Brand, L. and Withold, B. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 776-856
Stryer, L. (1968) *Science* 162, 526-533

4.4 ДРУГИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СВЯЗЫВАНИЯ

4.4.1 Радиоактивная метка

Этот пока еще часто применяемый метод все сильнее теряет свою популярность из-за риска, связанного с работой с радиоактивными материалами. Использование радиоактивной метки можно совместить с методом ультрафильтрации, при котором через мембрану пропускают раствор макромолекул и меченого лиганда. Свободный лиганд проходит сквозь мембрану и может быть зарегистрирован в фильтрате, а макромолекулы со связанным лигандом остаются на фильтре. После фильтрации фильтр вынимают, помещают в пробирку со сцинтилляционной жидкостью и проводят измерения на счетчике. Хотя радиоактивные

методы являются очень чувствительными, техника фильтрования не отличается высокой точностью, поскольку условия, в которых макромолекулы находятся на фильтре и в растворе, различаются между собой. Однако данный метод быстр и прост в исполнении и во всяком случае позволяет на качественном уровне оценить сродство макромолекул к лиганду. Для введения радиоактивной метки в лиганд можно использовать углерод ^{14}C , излучение которого отличается небольшой проникающей способностью (всего несколько сантиметров) и который можно ввести в любой органический лиганд. К сожалению, удельная радиоактивность ^{14}C сравнительно низкая, время полураспада большое, а при неосторожном обращении этот изотоп может попасть в организм при вдыхании (в форме $^{14}\text{CO}_2$). Высокой удельной радиоактивностью и коротким временем полураспада обладает изотоп фосфора ^{32}P , но его излучение довольно сильное и обладает большой проникающей способностью (около 1 м). Для многих целей подходит изотоп ^3H (тритий) со средним временем полураспада и слабой проникающей способностью, однако во многих соединениях тритий легко обменивается на нерадиоактивный изотоп водорода.

4.4.2 Отражательная интерференционная спектроскопия

Данный метод основан на отражении света тонкими прозрачными средами. Различие показателей преломления позволяет получать характерные интерференционные картины, зависящие от толщины отражающего слоя. Связывание молекул с поверхностью отражающего слоя изменяет интерференционную картину, что позволяет проводить количественный анализ связывания. Один из компонентов фиксируют на отражающей поверхности, например путем ковалентного связывания. С этим компонентом связывается другой компонент, а за процессом связывания следят с помощью интерференционной спектроскопии. Примером системы, которую можно изучать таким методом, является комплекс антитела с антигеном. Для реализации данного подхода разработаны специальные приборы.

Литература

- Birkert, O., Naake, H.M., Schtitz, A., Mack, J., Brecht, A., Jung, G. and Gauglitz, G. (2000) *Anal. Biochem.* 282, 200-208
Hussain, A.A., Award, R., Crooks, P.A., and Dittert, I.W. (1993) *Anal. Biochem.* 214, 495-499

5

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Получение ферментов в иммобилизованном виде — это необходимое условие для возможности их применения в промышленности. Ферменты, выполняющие роль биокатализаторов, присутствуют в реакционных системах в очень малом количестве, поэтому выделение ферментов из таких систем совершенно нецелесообразно с экономической точки зрения. Однако присутствие ферментов загрязняет конечный продукт реакции; кроме того, ввиду высокой стоимости ферментных препаратов, неизбежные потери фермента обходятся очень дорого. Для решения данной проблемы ферменты иммобилизуют на твердой подложке (матрице). В результате после проведения реакции ферментный препарат легко может быть отделен от реакционной среды и использован вновь. Такой подход способствовал широкому внедрению ферментов в промышленные процессы. Однако заметим, что из нескольких тысяч известных ферментов на настоящее время в крупномасштабном производстве задействовано лишь 15-20 ферментов. Это связано с серьезными сложностями, возникающими при иммобилизации ферментов, которые представляют собой очень чувствительные белковые структуры. Иммобилизации ферментов посвящен большой объем научной литературы. Первым примером иммобилизации фермента была иммобилизация инвертазы наугольной пыли в 1916 г. Широкое развитие методов иммобилизации началось в пятидесятых-шестидесятых годах двадцатого века.

Успех иммобилизации конкретного фермента зависит от множества факторов, так что общие правила иммобилизации ферментов вряд ли можно сформулировать. Для нахождения наиболее удачного метода обычно приходится испробовать несколько различных вариантов. До начала проведения иммобилизации нужно учесть следующие основные моменты:

- принцип иммобилизации
- тип матрицы для связывания фермента
- тип связи между матрицей и ферментом (спейсер)

Иммобилизованные ферменты находят множество применений. Иммобилизованные ферменты в биореакторах используются

для проведения технологических процессов. Ферментные электроды и биореакторы используются также в анализе, для контроля различных процессов и в медицинских целях.

5.1 ПРИНЦИПЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Существует несколько путей иммобилизации белков, причем каждый из них имеет свои преимущества и недостатки (рис. 5.1). Связывание в мягких условиях, имеющее целью максимально сохранить ферментативную активность, приводит к лабильности связи с матрицей, а иммобилизация в жестких условиях часто сопровождается потерей активности. Кроме того, в результате иммобилизации должна сохраняться возможность диффузии субстрата и продукта из раствора к ферменту и от него в раствор. В этом смысле идеального варианта иммобилизации также не существует. Кроме риска потери ферментативной активности

следует учитывать такие факторы, как стабильность матрицы с ферментом (ее сжимаемость, устойчивость к окислению), а также подверженность микробному заражению. Важной характеристикой матрицы является достаточно большая доступная для иммобилизации площадь поверхности на единицу объема. Наилучший пример — иммобилизация на стеклянных шариках, которые имеют сравнительно небольшую внешнюю поверхность, но разветвленную систему пор,

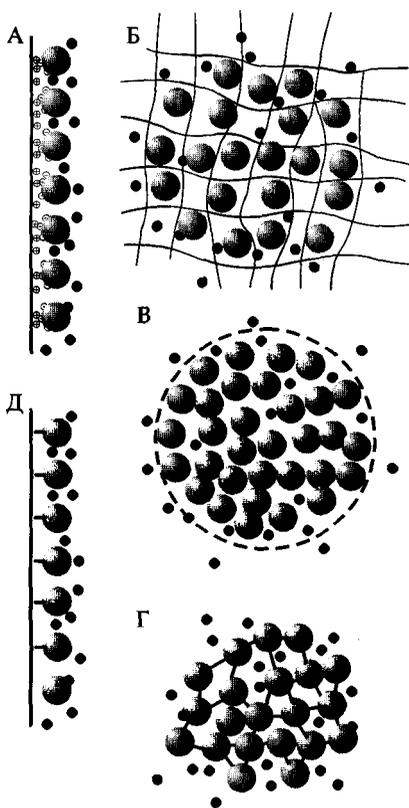


Рис. 5.1. Схематическое представление некоторых способов иммобилизации ферментов: А — адсорбция на анионообменной матрице; Б — включение в пористую матрицу; В — капсулирование; Г — образование перекрестных сшивок; Д — ковалентное связывание с твердой подложкой. Крупные кружки — молекулы фермента, черные кружки — молекулы субстрата или продукта

позволяющую значительно увеличить доступную для иммобилизации поверхность; получение такого стекла — довольно дорогой процесс. Плотность иммобилизации — т.е. число молекул фермента, связанных на единице поверхности матрицы, — это также очень важный показатель, который зависит от числа реакционноспособных групп матрицы.

5.1.1 Адсорбция

Простейший метод иммобилизации ферментов — их адсорбция на поверхности твердой матрицы; этот метод часто используется для очистки. Ионообменная (рис. 5.1,А), адсорбционная, гидрофобная и аффинная хроматография — все эти методы основаны на связывании белков с твердым носителем в определенных условиях. Если при связывании с матрицей фермент сохраняет свою стабильность, такой прием вполне можно использовать для его иммобилизации.

В качестве матриц используют такие ионообменные матрицы, как диэтиламиноэтил-(БЕАЕ) или карбоксиметил-(СМ) целлюлоза, а для иммобилизации в более мягких условиях — DEAE-или СМ-декстраны (DE- и СМ-Сефароза); кроме того, можно использовать гидроксипатит или фосфат кальция. Связывание белков с такими носителями сильно зависит от рН и ионной силы раствора — снижение ионной силы благоприятствует связыванию, а повышение ионной силы его ослабляет. Условия иммобилизации подбирают методом проб и ошибок; большим преимуществом метода являются мягкие условия проведения иммобилизации и отсутствие ковалентного связывания. Отсоединить белок от матрицы можно, например, путем повышения ионной силы раствора. В результате происходит регенерация матрицы и возвращение исходного белка, который можно собрать и хранить до следующего использования. Однако отсоединение белка от матрицы может быть и нежелательным, например при изменении рН или ионной силы в ходе реакции. Кроме того, некоторые компоненты реакционной смеси, такие как ионы металлов или тиоловые реагенты, также могут связываться с ионообменником и изменять его свойства.

Иная зависимость от ионной силы наблюдается при связывании белков с гидрофобными материалами типа фенол-Сефарозы: в данном случае с повышением ионной силы среды связывание усиливается. Однако подобный тип связывания чувствителен к понижению ионной силы и к присутствию детергентов или

органических веществ, таких как этанол, причем даже в невысоких концентрациях. Кроме того, стабильность большинства белков на неполярных носителях сравнительно низкая.

Связывание с аффинным носителем обычно является более специфичным и поэтому в меньшей степени зависит от влияния неспецифических факторов. Снять белок с носителя можно с помощью раствора свободного компонента, также имеющего сродство к носителю, путем повышения ионной силы или изменения рН. Следует, однако, учесть, что специфическое связывание фермента с носителем часто происходит через активный центр фермента, в результате чего связанный фермент становится неактивным.

5.1.2 Включение в пористую матрицу

При таком способе иммобилизации фермент оказывается заключенным в сито (поры) матрицы (рис. 5.1,Б). Этот способ иммобилизации является довольно мягким, поскольку подразумевает лишь пространственное ограничение подвижности фермента без его непосредственной фиксации на матрице. Размер пор сита должен быть достаточно малым, чтобы не допустить выхода молекул фермента, но в то же время достаточным для свободной диффузии субстратов и продуктов. Следовательно, такой вариант не подходит для иммобилизации ферментов, субстратами которых являются макромолекулы, например, для протеаз или РНКаз. Однако, к сожалению, в пористой матрице процесс диффузии может оказаться ограниченным даже для низкомолекулярных субстратов. В результате субстрат перестает подвергаться превращениям, а продукт накапливается вблизи фермента, вызывая его ингибирование, и не может быть полностью извлечен из реакционной смеси.

В качестве пористых матриц используют материалы на основе агарозы, желатина, полиакриламида и полисахаридов из водорослей (типа альгината или к-каррагинана). Для создания сетчатой структуры вещество следует нагреть (в случае полиакриламида температура повышается в ходе реакции полимеризации). Нагревание может оказать пагубное влияние на активность термолабильных ферментов. Захват в пористую матрицу часто применяют для иммобилизации клеток. Преимущество иммобилизации клеток перед иммобилизацией ферментов состоит в том, что нет необходимости проводить сложную процедуру очистки белка, однако повышение температуры при полимеризации для клеток может оказаться еще более губительным, чем для ферментов.

5.1.3 Капсулирование

С помощью данного метода молекулы фермента заключаются в мелкие частицы, окруженные пористой мембраной (рис. 5.1,В). Такой способ иммобилизации применяют в тех случаях, когда стараются избежать любого воздействия на нативную структуру фермента; он особенно хорошо подходит для иммобилизации чувствительных ферментов и клеток. Одновременно можно иммобилизовать несколько ферментов с различными активностями, например для проведения серии последовательных реакций. Следует избегать таких нежелательных явлений, как, например, саморасщепление протеаз.

Моделью капсулы можно считать небольшой диализный мешок, заполненный раствором фермента и помещенный в раствор субстрата. Однако такая система действует с достаточно низкой эффективностью, поскольку обмен молекул субстрата и продукта должен происходить на довольно больших расстояниях, а площадь поверхности мешка (т.е. граница раздела между раствором фермента и раствором субстрата) сравнительно мала. Гораздо эффективнее процесс капсулирования можно осуществить с помощью полых волокон. Фирменные картриджи полых волокон заполняют раствором фермента. С внешней стороны волокон пропускают раствор субстрата, а затем отделяют раствор образовавшегося продукта. Полые волокна достаточно устойчивы к механическим и химическим воздействиям и поэтому хорошо подходят для длительного промышленного использования. Живые клетки также включают внутрь волокон, а для поддержания их жизнедеятельности снаружи подают свежую питательную среду. Большая площадь поверхности полых волокон благоприятствует обмену субстрата и продукта, однако полностью извлечь фермент из волокон не представляется возможным.

Проблема больших диффузионных расстояний и малой площади поверхности может быть преодолена путем микрокапсулирования ферментов, при котором капсулы образуются непосредственно в концентрированном растворе фермента. В качестве матрицы используют полиамид или нитроцеллюлозу. Кроме того, ферменты могут быть включены в липосомы. Микрокапсулированные ферменты используются в медицине для направленного транспорта лекарств в организме. Для микрокапсулирования реакционную смесь готовят в концентрированном растворе фермента. Стенки капсул должны обладать теми же характеристиками, что и обсуждавшиеся выше пористые матри-

цы: они должны быть проницаемы для субстратов и продуктов, но непроницаемы для фермента. Здесь так же могут возникать аналогичные проблемы, связанные с ограничением диффузии субстрата и продукта.

Литература

Chambers, R.P., Cohen, W., and Baricos, W.H. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 291-317

5.1.4 Образование перекрестных сшивок

Молекулы ферментов трудно выделить из раствора из-за их небольшого размера. Однако эту проблему можно решить путем создания агрегатов, состоящих из большого числа молекул ферментов (рис. 5.1,Г). После проведения реакции агрегаты можно отделить центрифугированием или фильтрованием. Агрегаты можно получить путем создания перекрестных сшивок между молекулами в концентрированном растворе с помощью бивалентных реагентов типа глутарового альдегида или диметилсульберимидата (см. разд. 3.9.3). В результате образуются крупные белковые частицы, не заключенные ни в какую матрицу. Однако в результате ковалентного взаимодействия при образовании перекрестных сшивок в белках могут происходить определенные изменения, отражающиеся на их стабильности или активности. Для минимизации этих побочных эффектов существует целый ряд возможностей. Существует определенный набор сшивающих агентов, вводимых с помощью различных реакций. Такие реагенты различаются своей способностью взаимодействовать со специфическими группами белка. Большинство реагентов действует на аминокислотные группы белка, другие взаимодействуют специфическим образом с карбоксильными, гидроксильными или сульфгидрильными группами (табл. 5.1). Стабильность фермента часто можно повысить путем соиммобилизации с инертным белком типа бычьего сывороточного альбумина. Искусственные полиферментные комплексы можно создавать с помощью соиммобилизации различных ферментов.

Несмотря на определенные преимущества метода, иммобилизацию ферментов за счет образования перекрестных сшивок осуществляют сравнительно редко. С такими системами трудно работать, и они довольно чувствительны к внешним условиям. Поскольку суть процесса состоит в образовании ковалентных связей, метод не имеет значительного преимущества перед ковалентной иммобилизацией на твердой подложке, тогда как работать с иммобилизованными на подложке белками значительно удобнее.

5.1.5 Ковалентное связывание на твердом носителе

5.1.5.1 НОСИТЕЛИ

Ковалентное связывание ферментов с твердым носителем — наиболее важный метод иммобилизации (рис. 5.1Д). Наличие прочной ковалентной связи препятствует отсоединению фермента при жестких условиях, возникновения которых нельзя исключить в промышленных процессах. В качестве носителей выбирают вещества, которые также стабильны в таких условиях.

Носители для ковалентной иммобилизации белков должны удовлетворять следующим условиям:

- поверхность подложки не должна оказывать негативного воздействия на белок;
- необходимо наличие функциональных групп для связывания белка;
- необходима большая связывающая емкость;
- носитель не должен взаимодействовать с компонентами реакционной смеси;
- носитель должен быть пригоден для долгосрочного использования.

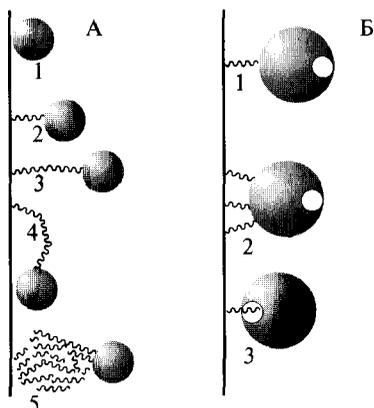
Для технологических целей используют устойчивые материалы в компактной форме: оксиды кремния и алюминия, стекло, керамику, а также синтетические полимерные материалы, такие как полиамиды, полистирол, полиакрилат, полиакриламид, виниловые полимеры и полиэфир. Они выдерживают такие условия, как, например, высокое давление, в частности при использовании в проточных системах и ферментерах. К сожалению, при иммобилизации многих ферментов на таких носителях происходит значительная потеря ферментативной активности. Для лабораторных целей в качестве носителей могут применяться полимерные углеводороды, такие как агароза, декстраны, хитины или целлюлоза, а также белки — коллаген, желатин или альбумин. Эти вещества имеют гидрофобные поверхности, обеспечивающие прямой контакт с белком, а также большое количество гидроксильных групп, пригодных для ковалентных взаимодействий. Однако для крупномасштабных задач такие носители слишком дороги и не выдерживают жестких условий работы. В частности, при их использовании нельзя применять высокое давление, как, например, в ферментерах с высокой скоростью потока. Кроме того, такие носители легко подвергаются заражению микроорганизмами.

5.1.5.2 СПЕЙСЕР

Тип связывания фермента с носителем играет не менее важную роль, чем материал, из которого изготовлен носитель. Часто с помощью реакций конденсации можно добиться непосредственного присоединения белка к поверхности подложки. Однако такой вариант присоединения не всегда приемлем, поскольку в непосредственной близости от поверхности носителя может снижаться активность фермента, функциональные группы белка и его активный центр могут быть задействованы во взаимодействии с поверхностью, а доступ субстрата к ферменту может быть затруднен как за счет пространственного фактора, так и в результате электростатического отталкивания. Чтобы избежать непосредственного контакта с поверхностью носителя и повысить подвижность фермента и его доступность для субстрата, между молекулой фермента и подложкой встраивают ножку (спейсер). Спейсер придает молекуле фермента необходимую подвижность, так что активный центр фермента перестает быть экранированным поверхностью носителя (рис. 5.2).

Чаще всего в качестве спейсера используют диаминогексан. Он связывается с матрицей и с белком, образуя со свободными карбоксильными группами амидные связи. При встраивании такого спейсера между белком и подложкой достигается расстояние порядка 1 мкм. На примере варьирования числа метиленовых групп между концевыми аминогруппами спейсера можно обсудить критерии оптимального расстояния между ферментом и носителем. Если уменьшать длину спейсера, фермент приближается к носителю, в результате чего между ними усиливается взаимодействие. Для предотвращения этого нежелательного

Рис. 5.2. Иммобилизация белка на носителе с помощью спейсеров различного типа. А — 1) непосредственное связывание белка с матрицей; 2) короткий спейсер; 3) длинный спейсер; 4) слишком длинный спейсер, способный изогнуться таким образом, что фермент опять оказывается у поверхности носителя; 5) объемный спейсер. Б — расположение спейсера по отношению к активному центру: 1) спейсер находится с противоположной стороны от активного центра; 2) наличие нескольких спейсеров; 3) связывание и блокировка активного центра



контакта длину спейсера можно увеличить, однако не до бесконечности, поскольку гибкая и длинная углеводородная цепь может изогнуться таким образом, что вновь приведет к контакту фермента с матрицей. Следовательно, очень длинный спейсер не имеет никакого преимущества, а оптимальным является спейсер совершенно определенной длины. Если по каким-либо причинам все же необходим более длинный спейсер, его гибкость следует ограничить с помощью жестких и объемных молекул, например, инертных белков.

Выбор подходящего спейсера определяется не только его длиной. Еще один важный фактор — способ его присоединения. Обычно спейсер — это бифункциональная молекула, имеющая на концах либо две одинаковые реакционноспособные группы (диаминогексан, глутаровый альдегид, диметилсуберимидат), либо две разные группы (см. табл. 5.1). Следует решить, с каким типом функциональных групп матрицы и белка (аминогруппы, карбоксильные, гидроксильные или сульфгидрильные группы) должен связаться спейсер. Для иммобилизации необходимо успешное протекание реакции конденсации. Кроме того, важно выбрать правильный порядок проведения реакций присоединения спейсера к белку и к носителю. Преимущество присоединения спейсера сначала к белку состоит в том, что в этом случае можно зафиксировать снижение активности фермента непосредственно в результате блокирования важных для катализа групп.

Основная роль спейсера состоит в том, чтобы удалить белок от поверхности носителя и тем самым ослабить неблагоприятное воздействие носителя. Однако фермент при этом находится в непосредственной связи со спейсером, так что в этом случае на стабильность белка могут повлиять свойства самого спейсера, в частности его полярность. Алифатические углеводороды, такие как диаминогексан, являются неполярными и могут использоваться для иммобилизации далеко не всех белков. В принципе, в качестве спейсеров можно использовать те же реагенты, что используются для образования перекрестных сшивок. Практические примеры иммобилизации рассмотрены ранее в разд. 3.9.3.

5.2 МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Ниже рассмотрено несколько методов иммобилизации белков. Однако, ввиду огромного разнообразия ферментов, спейсеров и носителей, представляется возможным обсудить лишь некоторые из существующих подходов.

5.2.1 Микрокапсулирование в нейлоновые шарики

Необходимые реагенты и растворы

0,44 г 1,6-диаминогексана, 0,16 г гидрокарбоната натрия, 0,66 г карбоната натрия в 10 мл воды

Раствор фермента (~2 мг/мл)

18 мМ себацилдихлорид (M_T 239,1; 0,4 мл в 20 мл хлороформа и 80 мл циклогексана), свежеприготовленный раствор

0,9%-ный хлорид натрия в 0,05 М фосфате калия, pH 7,0

Ход реакции

Смешивают равные объемы растворов фермента и 1,6-диаминогексана, а затем очень медленно, по каплям, с помощью шприца добавляют раствор себацилдихлорида (10 мкл), чтобы образующиеся нейлоновые шарики не касались друг друга. Через 5 мин органическую фазу декантируют, а после полного испарения органического растворителя капсулы промывают раствором 0,9%-ного NaCl в 0,05 М фосфате калия, pH 7,0.

Литература

Chang, T.M.S. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 201-218

5.2.2 Включение в полиакриламидный гель

Полиакриламидные гели используются не только для проведения электрофоретического разделения белков, но и для иммобилизации. Длинные полимерные цепи полиакриламида соединены перекрестными сшивками 1Ч,1Ч'-метиленбисакриламида (рис. 5.3). Реакция полимеризации начинается в присутствии N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина (TEMED) и персульфата аммония. Изменяя количество сшивающего агента, можно контролировать размер пор геля, добиваясь того, чтобы фермент прочно удерживался гелем, а субстраты и продукты могли свободно диффундировать к активному центру и от него.

Необходимые реагенты и растворы

Акриламид (M_p 71,1)

1Ч,М'-метиленбисакриламид (M_T 154,2)

N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED, M_m 116,2)

Персульфат аммония (M_m 228,2; 10% раствор в воде); свежеприготовленный раствор

0,1 М Трис-HCl, pH 7,2

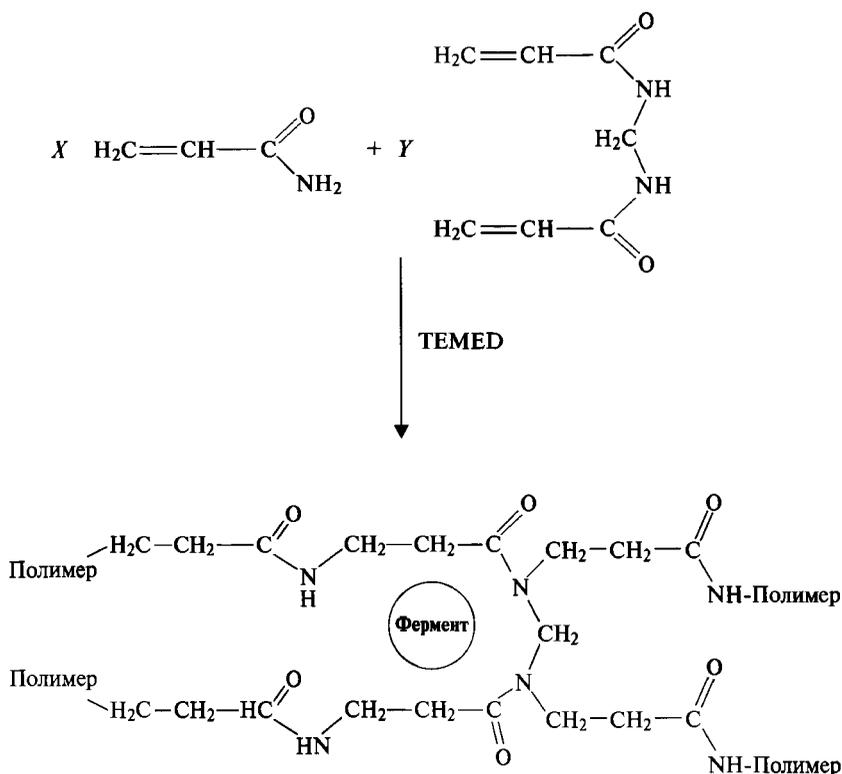


Рис. 5.3. Включение фермента в гель, образующийся при сополимеризации акриламида и метиленабисакриламида; X и Y — стехиометрические коэффициенты

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

Раствор фермента (8 мг в 8 мл 0,1 М Трис-НС1, pH 7,2)

Ход реакции

К 8 мл раствора фермента добавляют 1,5 г акриламида, 80 мг метиленабисакриламида, 10 мкл TEMED и 30 мкл 10%-ного персульфата аммония. Реакционная смесь должна находиться при температуре 37 °С, причем перегрева следует избегать. Полимеризация происходит примерно за 20 мин. Затем гель разрезают на кусочки с помощью скальпеля, приливают 10 мл раствора 0,1 М фосфата калия, pH 7,5, и измельчают далее с помощью блендера. Частички геля трижды промывают на воронке и используют для анализа.

5.2.3 Ковалентная иммобилизация фермента на поверхности непористого стекла

Стекло прекрасно подходит для иммобилизации ферментов, особенно для использования в промышленных процессах, поскольку устойчиво к действию сильных кислот и растворителей, а также имеет подходящую твердую структуру. Серьезным недостатком для иммобилизации является инертная природа стекла и его сравнительно неразвитая поверхность. Для активации поверхности стекла проводят силанизацию. Этот процесс описан ниже на примере обработки обычного стекла. В следующем разделе описана процедура иммобилизации на стекле с контролируемым размером пор, площадь доступной поверхности которого значительно больше.

Для иммобилизации используют стеклянные шарики диаметром 1 мм. Активацию поверхности стекла осуществляют путем силанизации с последующим введением аминогрупп. Далее аминогруппы взаимодействуют с *n*-нитробензоилхлоридом, нитрогруппы восстанавливаются до аминогрупп, те под действием азотистой кислоты превращаются в катионы диазония, с которыми через остатки тирозина взаимодействует белок (рис. 5.4).

При работе с агрессивными и токсичными реагентами нужно проявлять осторожность. Использование магнитных мешалок следует избегать, поскольку они могут повреждать поверхность модифицированного стекла.

Необходимые реагенты и растворы

Стеклянные шарики диаметром 1 мм

3-Аминопропилтриэтоксисилан

n-Н итробензоилхлорид

Дихлорметан

Триэтиламин

Нитрит натрия

Соляная кислота, концентрированная

Соляная кислота, 2М

Дитионит натрия

Азотистая кислота, 5%

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

Раствор фермента (1 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, рН 7,5)

Активация стекла

Стеклянные шарики (10 г) в 40 мл 5%-ной азотистой кислоты инкубируют при 80-90 °С 1 ч. Затем их трижды промывают

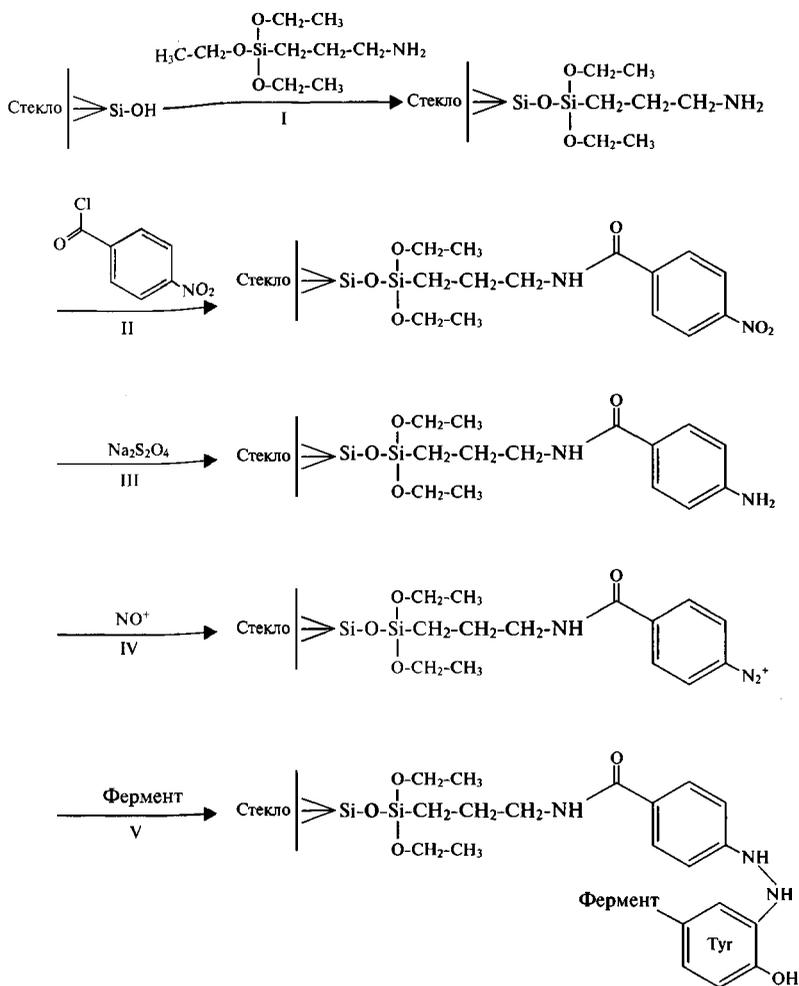


Рис. 5.4. Силанизация поверхности стекла и иммобилизация фермента.

I. Взаимодействие Si-OH групп на поверхности стекла с 3-аминопропилтриэтоксисилоаном. II. Взаимодействие концевых аминогрупп с л-нитробензоилхлоридом. III. Восстановление нитрогрупп дитионитом натрия. IV. Образование катиона диазония под действием азотистой кислоты. V. Присоединение фермента через остаток тирозина

дистиллированной водой и помещают в емкость из полиэтилена, чтобы избежать иммобилизации фермента на поверхности сосуда. Добавляют 10 мл воды и 3 г 3-аминопропилтриэтоксисилана, а затем доводят pH до значения 3-4 (сначала с помощью концентрированной, а затем разбавленной соляной

кислоты; для контроля рН используют индикаторную бумагу, поскольку рН-электрод при такой процедуре может быть поврежден). Смесь инкубируют 12 ч при 65 °С. Затем шарики промывают пять раз водой и три раза ацетоном (каждый раз по 20 мл) на керамическом, а не на стеклянном фильтре. Шарики высушивают 20 мин при 55 °С.

Получение катиона диазония

Для следующей процедуры можно использовать стеклянные емкости. К активированным стеклянным шарикам добавляют 25 мл дихлорметана, 1,5 г триэтиламина и 5 г я-нитробензоилхлорида и кипятят с дефлегматором 4 ч. От следов воды следует тщательным образом избавляться. Затем шарики трижды промывают дихлорметаном (каждый раз по 10 мл) и быстро высушивают при 55 °С. Для диазотирования свободных аминогрупп шарики на 20 мин погружают в раствор, содержащий 1 г NaNO_2 в 100 мл 2 М HCl , при комнатной температуре. После интенсивной промывки водой шарики на 1 ч помещают в 40 мл раствора, содержащего 2 г дитионита натрия в 40 мл воды. Шарики с образовавшимися на поверхности ариламиновыми группами трижды промывают водой (по 20 мл) и переносят в круглодонную колбу, куда затем добавляют 88 мл 2 М HCl . Колбу присоединяют к вакуумному испарителю и вращают на ледяной бане (при температуре 0 °С). Через 20 мин маленькими порциями добавляют 1,12 г NaNO_2 ; между добавлениями очередных порций колбу вращают без подключения вакуума. После добавления последней порции колбу вращают 10 мин, присоединив к слабому водоструйному насосу (около 20 мбар) для удаления азотистых паров. Шарики с катионами диазония на поверхности трижды промывают ледяной водой (по 20 мл) и немедленно используют для иммобилизации. До начала иммобилизации шарики должны храниться при температуре 4 °С.

Иммобилизация фермента

К шарикам добавляют раствор фермента (10 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, рН 7,5) и медленно вращают колбу на протяжении ночи (12-16 ч) при 4 °С. Затем шарики трижды промывают раствором 0,1 М фосфата калия, рН 7,5 (по 5 мл). Чтобы оценить эффективность иммобилизации, определяют концентрацию свободного белка и активность фермента в супернатанте.

5.2.4 Имобилизация на стекле с контролируемым размером пор

Стекло с контролируемым размером пор (Bioran®) — специальное плавленное стекло, которое благодаря наличию микропор имеет большую площадь поверхности. Такое стекло продается в активированной форме, подготовленной для проведения иммобилизации. В описываемом ниже эксперименте используется стекло с размером пор 46 нм и с молекулами глицерина, связанными с его поверхностью через силоксановые мостики. Спиртовые группы глицерина под действием метапериодата окисляются до альдегидных групп (рис. 5.5). Далее при добавлении я-фенилендиамин образуются основания Шиффа, а стабилизация связи достигается путем восстановления борогидридом натрия. В присутствии азотистой кислоты концевые аминогруппы превращаются в катионы диазония, с которыми через остатки тирозина может связаться белок.

Необходимые реагенты и растворы

Стекло с контролируемым размером пор (Bioran®-CPG,- Pierce Chemical Comp. Rockford, IL, Schott Glas, Mainz, Germany)

NaIO_4

NaBH_4

я-Фенилендиамин

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

Раствор фермента (1 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5)

Активация стеклянных шариков

Стеклянные шарики (1 г) помещают в круглодонную колбу объемом 100 мл и приливают раствор, содержащий 91 мг NaIO_4 в 70 мл воды. Колбу вращают на роторном испарителе 1ч под давлением 0,3-0,4 бар. Образующиеся шарики с альдегидными группами на поверхности промывают несколько раз водой (общий объем 350 мл). Далее к шарикам в колбе приливают 70 мл воды, содержащей 77 мг я-фенилендиамин, и вращают колбу на роторном испарителе под давлением 0,3-0,4 бар. Через 20 мин добавляют 7 мг NaBH_4 , а еще через 60 мин реакцию прекращают и несколько раз тщательно промывают шарики водой (каждый раз по 20 мл).

Затем шарики заливают 88 мл 2 М соляной кислоты. Колбу вращают в ледяной бане, охлаждая содержимое до 0 °С. В течение 20 мин медленно порциями добавляют 1,12 г NaNO_2 ,

между добавлениями вращая колбу без подключения вакуума. После добавления последней порции колбу вращают 10 мин, присоединив к слабому водоструйному насосу (около 20 мбар) для удаления азотистых паров. Шарики с образовавшимися на поверхности катионами диазония трижды промывают ледяной водой (по 20 мл) и немедленно используют для иммобилизации. До начала иммобилизации шарики необходимо хранить при 4 °С.

Иммобилизация фермента

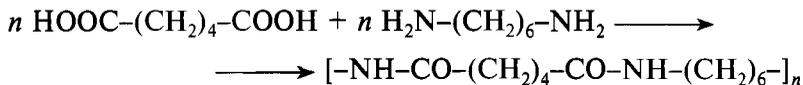
К шарикам в колбе объемом 25 мл добавляют раствор фермента (10 мг в 10 мл 0,1 М фосфата калия, pH 7,5) и медленно вращают колбу на протяжении ночи (12-16 ч) при 4 °С. Затем шарики трижды промывают раствором 0,1 М фосфата калия, pH 7,5 (по 5 мл). В супернатанте определяют концентрацию свободного белка и активность фермента, чтобы оценить эффективность иммобилизации.

Литература

- Gabel, D. and Axen, R. (1976) *Meth. Enzymol* 44, 383-393
 Weetall, H.H. (1976) *Meth. Enzymol.* 44, 134-148

5.2.5 Ковалентная иммобилизация на полиамидной матрице

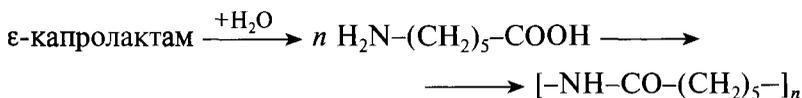
Синтетические полимеры широко используются в качестве матриц для иммобилизации ферментов. Чаще всего применяются полиамиды, полиэферы, полиэтилены и поливиниловые спирты. Полиамиды получают путем поликонденсации алифатических дикарбоновых кислот с диаминами. Наиболее широко используемым техническим полиамидом является нейлон — длинноцепочечный полимер, образующийся при конденсации эквимолярных количеств адипиновой кислоты и диаминогексана (полигексаметиленадипамид, полиамид-6,6; цифра 6 означает, что как кислота, так и амин состоят из 6 атомов углерода):



Нейлоновые нити получают непосредственно из расплава; они обладают высокой эластичностью и прочностью. Преимуществом иммобилизации на нейлоновом носителе является его устойчи-

вость по отношению к микробному заражению и сравнительно высокая гидрофобность.

Для получения полиамида-6 (перлон, дедерон) нужен только один компонент — ϵ -капролактam. Он присоединяет воду, образуя ϵ -аминокапроновую кислоту, и конденсируется с другими молекулами ϵ -капролактама с образованием полимера:



Утот полимер устойчив к действию щелочей, но растворяется в кислотах.

Иммобилизация ферментов на нейлоновых носителях в основном достигается путем капсулирования или адсорбции на поверхности полимера. Ковалентное связывание затруднено по той причине, что функциональные группы, пригодные для связывания, располагаются только на концах полимерных цепей. Для достижения высокой плотности иммобилизации используются две альтернативные стратегии. В присоединении реакционноспособных групп могут участвовать неподеленные электронные пары кислорода или азота. В другом варианте можно провести частичное расщепление некоторых амидных связей в молекуле полимера, в результате чего образуются свободные аминогруппы и карбоксильные группы, которые можно использовать для иммобилизации. Частичный гидролиз осуществляют в строго контролируемых условиях, чтобы не допустить разрушения полимера.

5.2.6 O-Алкилирование с помощью тетрафторбората триэтилоксония

Белки можно связать с полиамидом путем алкилирования через кислород амидной связи. Алкилирующий агент для этой реакции синтезируют из эпихлоргидрина (1-хлор-2,3-эпоксипропана) и эфира трифторида бора в диэтиловом эфире:



Синтез проводят в условиях абсолютного отсутствия влаги; кроме того, следует учитывать высокую токсичность реагентов.

Необходимые реагенты и растворы

Диэтиловый эфир

Эпихлоргидрин (10%, об./об.) в диэтиловом эфире

Эфират трифторида бора (5%, об./об.) в диэтиловом эфире

Дихлорметан

Ход реакции

Из капельной воронки 50 мл 10%-ного (об./об.) эпихлоргидрина в безводном диэтиловом эфире медленно добавляют к 200 мл 5%-ного (об./об.) раствора эфирата трифторида бора в диэтиловом эфире. После кипячения (1 ч, с дефлегматором) смесь продолжают перемешивать еще 3 ч при комнатной температуре. Осадок триэтилоксония тетрафторбората трижды промывают диэтиловым эфиром и растворяют в дихлорметане в концентрации 10% (мас./об.).

Алкилирование полиамидов протекает по схеме, изображенной на рис. 5.6. При инкубации необходимого количества полиамидной ткани в 10%-ном (мас./об.) тетрафторборате триэтилоксония в дихлорметане в течение 15 мин при комнатной температуре образуется имид полиамида. Избыток алкилирующего агента удаляют путем двукратной промывки продукта дихлорметаном и диоксаном на васаывающем фильтре.

Сложность данного метода связана с необходимостью исключить даже следовые количества влаги, а также с токсичностью реагентов. Органические растворители могут растворять компоненты полимерных материалов, такие как клей, что снижает их прочность. С другой стороны, условия алкилирования легко контролировать путем изменения времени реакции и концентрации алкилирующего агента.

Полиамид-имид — очень реакционноспособное соединение, так что иммобилизацию на нем следует проводить немедленно.

Существует несколько стратегий иммобилизации.

- Прямая иммобилизация путем инкубации с концентрированным раствором фермента (см. разд. 5.2.7, без стадии активации глутаровым альдегидом).
- Введение спейсера путем инкубации полиамид-имида в 10%-ном (мас./об.) растворе 1,6-диаминогексана в метаноле, 3 ч при комнатной температуре. Избыточный реагент удаляют, промывая продукт метанолом.

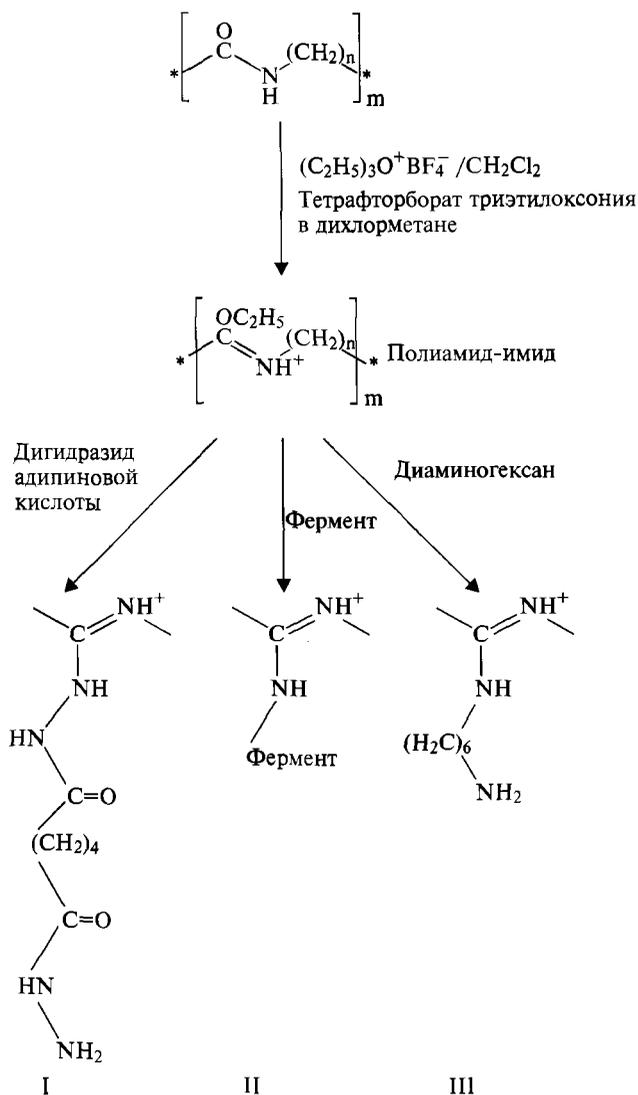


Рис. 5.6. Ковалентная иммобилизация фермента на полиамидном носителе.

Алкилирование полиамида происходит в результате обработки тетрафторборатом триэтилоксония. Фермент связывается с носителем с помощью дигидразида адипиновой кислоты через дигидразидное производное (I ; см. также рис. 5.7), путем прямой фиксации (II), или через 1,6-диаминогексан (III)

- Получение гидразидного производного полиамида путем инкубации полиамид-имида 3 ч при комнатной температуре с 3%-ным (мас./об.) раствором дигидразида адипиновой кислоты в формамиде. Избыток реагента удаляют путем промывки растворителем.

Перечисленные выше производные полиамида практически нетоксичны. Их хранят при комнатной температуре на протяжении нескольких месяцев и активируют перед использованием.

Гидразидное производное полиамида активируют путем обработки нитритом натрия в соляной кислоте (рис. 5.7). В результате реакции образуется азидная группа, с которой может связаться белок. В альтернативном варианте при обработке глутаровым альдегидом концевая аминогруппа гидразида образует основание Шиффа, а белок может присоединяться ко второй альдегидной группе реагента через другое основание Шиффа (рис. 5.7; см. также разд. 5.2.7).

5.2.7 Связывание фермента с аминокруппами после частичного гидролиза полиамида

Частичный гидролиз полиамида — это довольно простой способ подготовки данного типа носителя к иммобилизации, требующий, однако, строгого контроля условий процесса с целью не допустить чрезмерного разрушения структуры полиамида. Реакция иммобилизации протекает в четыре стадии.

1. Травление полимерного материала для увеличения площади поверхности и доступности для проникновения воды.
2. Частичное расщепление амидных связей.
3. Активация свободных аминокрупп и карбоксильных групп.
4. Связывание фермента с активированным полиамидом.

Необходимые реагенты и растворы

0,2 М боратный буфер (борная кислота/борат натрия), pH 8,5

Метанол

5%-ный (мас./об.) глутаровый альдегид

CaCl_2

3,65 М HCl

1Ч,1Ч-Диметил-1,3-пропандиамин

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5

Раствор фермента (0,5 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5)

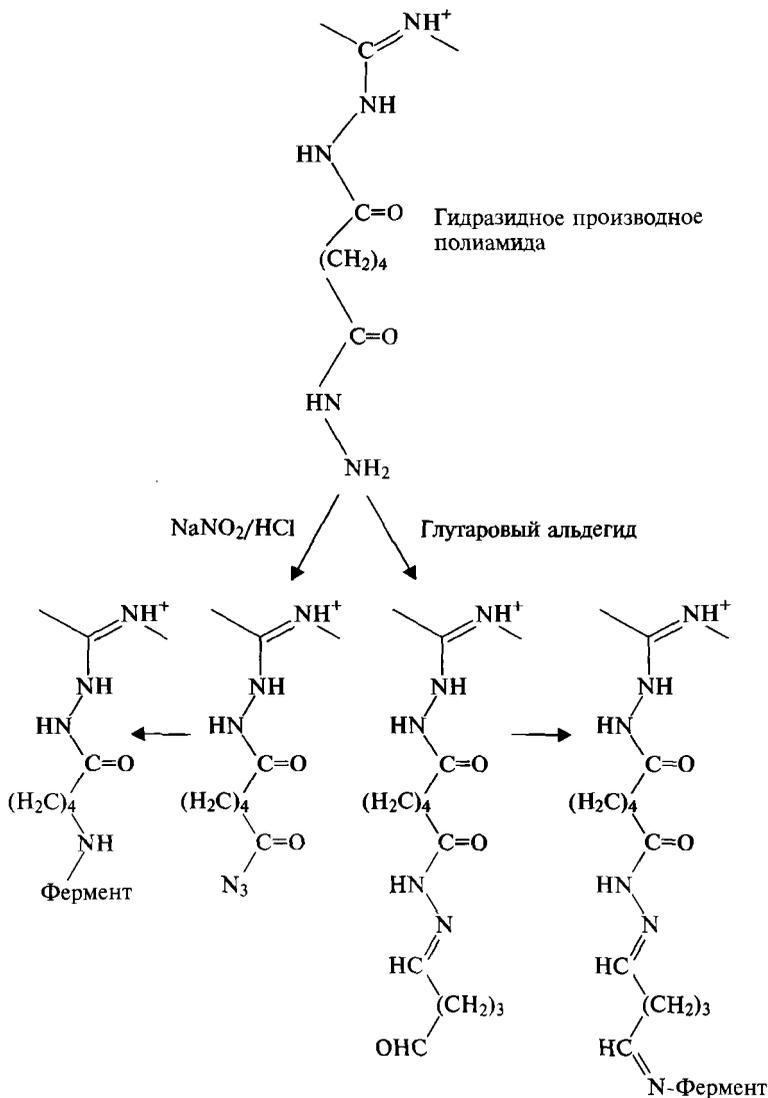


Рис. 5.7. Активация гидразидного производного полиамида с помощью нитрита натрия в соляной кислоте или с помощью глутарового альдегида с последующим присоединением фермента через образование оснований Шиффа

Травление полиамида

Определенное количество фрагментов полимерного материала (например, 10 кусочков по 2 см²) помещают в круглодонную колбу на 250 мл и заливают смесью 18,6% (мас./мас.) CaCl₂ и 18,6% (мас./мас.) воды в метаноле. Колбу вращают 20 мин на роторном испарителе (без вакуума) при 50 °С. Затем кусочки полимера тщательно промывают водой на фильтре.

Частичное расщепление амидных связей

Гидролитическое расщепление. Кусочки полиамида погружают в 3,65 М HCl и вращают 40 мин на роторном испарителе (без вакуума) при 50 °С. Затем полимер интенсивно промывают с помощью фильтра или воронки сначала водой, а затем 0,2 М боратным буфером, pH 8,5.

Негидролитическое расщепление. Кусочки полимера погружают в метанол, затем высушивают и инкубируют с 25 мл Ы,К-диметил-1,3-пропандиамина 12 ч при 70 °С. От аминов избавляются путем интенсивного промывания водой на фильтре.

Активация свободных аминогрупп

Фрагменты полимерного материала после гидролитического или негидролитического расщепления амидных связей или после получения производных помещают в круглодонную колбу и заливают 25 мл 5%-ного (мас./об.) глутарового альдегида в 0,2 М боратном буфере, pH 8,5; колбу вращают на роторном испарителе 15 мин при 20 °С без подключения вакуума. Избыток глутарового альдегида удаляют путем интенсивного промывания 0,1 М фосфатом калия, pH 7,5, с помощью фильтра.

Связывание фермента с активированной полиамидной матрицей

Сразу после промывки носителя к нему добавляют раствор фермента (0,2-0,5 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5), так чтобы кусочки полимера были полностью покрыты раствором, и инкубируют 3 ч при 4 °С. Не связавшийся фермент удаляют путем нескольких промываний на фильтре с помощью 0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5. Затем концентрацию соли снижают, промывая носитель с иммобилизованным ферментом 0,1 М фосфатом калия, pH 7,5. Если фермент предполагается хранить недолго, носитель с ферментом погружают в раствор 0,1 М фосфата калия, pH 7,5, и хранят при 4 °С. Для долгосрочного хранения носитель с ферментом промывают водой и высушивают на воздухе (далеко не все ферменты выдерживают эту процедуру).

Литература

- Hornby, W.E. and Goldstein, L. (1976) *Meth. Enzymol.* 64, 119-134
Moeschel, K., Nouaimi, M., Steinbrenner, C., and Bisswanger, H. (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 82, 190-199
Morris, D.L., Campbell, J., and Hornby, W.E. (1975) *Biochem. J.* 174, 593-603

5.2.8 Связывание фермента с карбоксильными группами после частичного гидролиза полиамида

Травление полиамида и расщепление амидных связей описано выше (разд. 5.2.7). Свободные аминогруппы блокируются путем добавления ледяного раствора 1%-ного (мас./об.) нитрита натрия в 0,5 М HCl (10 мин) с последующей инкубацией в этом же растворе при 40 °C (20 мин).

Необходимые растворы и реагенты

0,5 М соляная кислота

Диаминогексан

Дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД)

Готовят раствор, содержащий 1% (мас./об.) диаминогексана и 1% (мас./об.) ДЦКД в дихлорметане

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5

Раствор фермента (0,5 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5)

Активация свободных карбоксильных групп

Фрагменты полиамидного материала инкубируют в растворе, содержащем 1% (мас./об.) диаминогексана и 1% (мас./об.) ДЦКД в дихлорметане, 4 ч при 10 °C. Свободный диаминогексан удаляют, промывая полимер последовательно дихлорметаном, ацетоном и ледяной водой (по 10 мл каждого вещества).

Активацию проводят путем инкубации в 10 мл 1%-ного (мас./об.) нитрита натрия в 0,5 М соляной кислоте, 20 мин при 0 °C. Затем фрагменты полимера промывают 10 мл охлажденной во льду 0,5 М соляной кислотой.

Иммобилизация фермента и правила хранения ферментного препарата описаны в разд. 5.2.7.

5.2.9 Иммобилизация фермента на полиэфирной матрице

Полиэфиры синтезируют путем конденсации дикарбоновых кислот с реагентами, имеющими две спиртовые группы. Часто

используемый полиэтилентерефталат (ПЭТ; Terylene®, Trevira®, Diolen®) образуется при поликонденсации терефталата с этиленгликолем в двухстадийном процессе с триоксидом сурьмы в качестве катализатора (рис. 5.8). Сначала в условиях избытка этиленгликоля образуется низкомолекулярный полимер с концевыми гидроксильными группами, который в результате отщепления молекул этиленгликоля превращается в полимер с более высокой молекулярной массой.

Полиэфиры имеют практически неполярную поверхность, поэтому они менее пригодны для иммобилизации ферментов. Для этой цели лучше подходят сополимеры полиэфира и вискозы

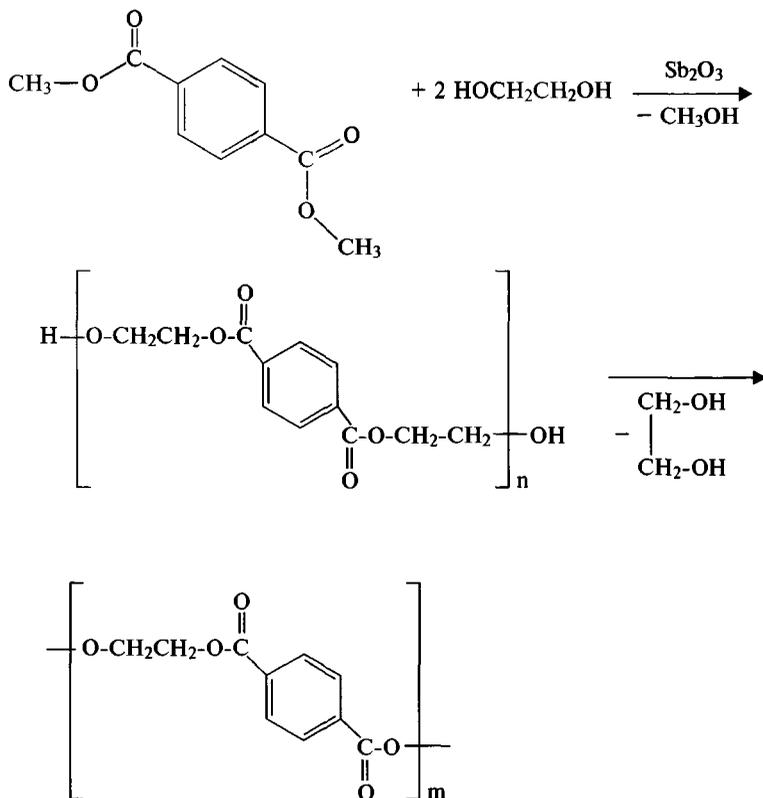


Рис. 5.8. Образование полиэфира в результате поликонденсации терефталата с этиленгликолем. Две молекулы этиленгликоля реагируют с молекулой диметилтерефталата при участии триоксида сурьмы в качестве катализатора. В результате образуется низкомолекулярный полимер, который после отщепления молекул этиленгликоля превращается в полимер с большей молекулярной массой

(Rayon®). Эти полимеры обладают большей гидрофильностью и содержат гидроксильные группы, пригодные для иммобилизации. Для иммобилизации ферментов на полиэфирах применим тот же подход, что описан выше для полиамидов; это может быть как алкилирование, так и частичный гидролиз полимера.

Необходимые реагенты и растворы

Дихлорметан

Диаминогексан

Дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД)

Готовят раствор, содержащий 1% (мас./об.) диаминогексана и 1% (мас./об.) ДЦКД в дихлорметане

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5

Раствор фермента (0,5 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5)

Кислотный гидролиз и активация с помощью ДЦКД

Как было описано выше для полиамидов, готовят фрагменты нетканого полиэфирного материала (например, 10 фрагментов размером 20 x 20 мм). Травление и гидролиз полиэфира производят так же, как описано в разд. 5.2.7. Свободные карбоксильные группы активируют путем инкубации в 50 мл раствора, содержащего 1% (мас./об.) диаминогексана и 1% (мас./об.) ДЦКД в дихлорметане, 4 ч при 10 °С. Свободный диаминогексан удаляют, промывая полимер последовательно дихлорметаном, ацетоном и ледяной водой (по 10 мл каждого вещества) на всасывающем фильтре или фритте.

Связывание фермента с активированной полиэфирной матрицей

Сразу после промывки носителя его погружают в раствор фермента, так чтобы кусочки полимера были полностью покрыты раствором (например, берут 10 мл раствора фермента), и инкубируют 3 ч при 4 °С. Не связавшийся фермент удаляют путем многократной промывки 0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5. Затем концентрацию соли снижают, промывая носитель с иммобилизованным ферментом 0,1 М фосфатом калия, pH 7,5. Для недолгого хранения (не более 1 недели) носитель с ферментом помещают в раствор 0,1 М фосфата калия, pH 7,5, и хранят при 4 °С. Для долгосрочного хранения носитель с ферментом промывают водой для удаления буфера и высушивают на воздухе (наиболее чувствительные ферменты не выдерживают этой процедуры).

Литература

Daka, N.J. and Laidler, K.J. (1978) *Can. J. Biochem.* 56, 774-779

5.2.10 Иммуобилизация с помощью щелочного гидролиза и активации тозилхлоридом

Данный метод позволяет частично расщепить эфирные связи в щелочной среде. Для активации используют л-толуолсульфохлорид (тозилхлорид) в ацетоне. Далее к этим группам присоединяются карбоксильные или гидроксильные группы фермента (рис. 5.9).

Необходимые реагенты и растворы

0,1 М фосфат калия, pH 7,5

0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5

10%-ный (мас./об.) NaOH

Ацетон

10%-ный (мас./об.) л-толуолсульфохлорид (M_r 190,7) в ацетоне

Раствор фермента (1 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5)

Щелочной гидролиз и активация тозилхлоридом

Фрагменты полиэфирного материала (например, 10 фрагментов площадью 2 см²) инкубируют при комнатной температуре 10 мин в 10 мл 10%-ного (мас./об.) NaOH. Затем носитель интенсивно промывают на всасывающем фильтре: три раза водой и пять раз ацетоном (каждый раз используют 10 мл жидкости).



Рис. 5.9. Иммуобилизация фермента на полиэфирной матрице при активации тозилхлоридом

Сразу после промывки, не высушивая, кусочки полиэфира переносят в 10 мл 10%-ного (мас./об.) тозилхлорида в ацетоне и инкубируют 20 мин. Затем их промывают на фритте трижды ацетоном, трижды водой и дважды 0,1 М фосфатом калия, рН 7,5, используя каждый раз по 10 мл жидкости.

Иммобилизация фермента

Сразу после промывки носителя его погружают в раствор фермента, полностью покрывая раствором (около 10 мл), и инкубируют в течение ночи при 4 °С, осторожно встряхивая. Не связавшийся фермент удаляют, промывая носитель на всасывающем фильтре 0,5 М раствором NaCl в 0,1 М фосфате калия, рН 7,5, а затем просто 0,1 М фосфатом калия, рН 7,5. Хранят в том же буфере. Для долгосрочного хранения носитель с ферментом промывают водой для удаления буфера и высушивают на воздухе.

5.2.11 Щелочной гидролиз и активация карбонилдиимидазолом

Этот метод активации более эффективный и мягкий, чем активация тозилхлоридом.

Необходимые реагенты и растворы

0,1 М фосфат калия, рН 7,5

0,5 М NaCl в 0,1 М фосфате калия, рН 7,5

10%-ный (мас./об.) NaOH

Диоксан

3,5% (мас./об.) карбонилдиимидазол (M_T 162,2) в диоксане

Раствор фермента (1 мг/мл в 0,1 М фосфате калия, рН 7,5)

Щелочной гидролиз и активация

Фрагменты полиэфирного материала (10 фрагментов площадью 2 см²) инкубируют 10 мин при комнатной температуре в 10 мл 10%-ного (мас./об.) NaOH. Затем пять раз промывают водой (каждый раз используют 10 мл воды), на 30 мин погружают в диоксан и затем пять раз промывают диоксаном для удаления следов воды. После промывки носитель 30 мин инкубируют в растворе 3,5%-ного (мас./об.) карбонилдиимидазола в диоксане. В заключение кусочки полиэфира пять раз промывают диоксаном и трижды 0,1 М фосфатом калия, рН 7,5.

Иммобилизация фермента

После промывки носитель погружают в раствор фермента (около 10 мл) и инкубируют на протяжении ночи при комнатной температуре или при 4 °С (лабильные ферменты). Не связавшийся фермент удаляют, промывая носитель на фильтре 0,5 М раствором NaCl в 0,1 М фосфате калия, pH 7,5, а затем 0,1 М фосфатом калия, pH 7,5. Хранить носитель с иммобилизованным ферментом можно на протяжении недели при температуре 4 °С в том же буфере. Для долгосрочного хранения носитель с ферментом быстро промывают водой и высушивают на воздухе (такая процедура не рекомендуется для особенно чувствительных ферментов).

Литература

- Boyd, S. and Yamazaki, H. (1993) *Biotechnol. Tech.* 7, 277-282
Howlett, J.R., Armstrong, D.W., and Yamazaki, H. (1991) *Biotechnol. Tech.* 5, 395-400
Nouaimi, M., Moschel, K., and Bisswanger, H. (2001) *Enz. Microb. Technol.* 29, 567-574

5.3 МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Аналитические методы для изучения иммобилизованных ферментов отличаются в некоторой степени от методов, применяемых для изучения ферментов в растворе, в частности, это относится к определению ферментативной активности и концентрации белка. Напротив, данные методы имеют общие черты с методами анализа мембранных белков. Ввиду большого разнообразия способов иммобилизации, невозможно предложить какого-то общего метода анализа, поскольку метод анализа зависит от способа иммобилизации. Часто количество иммобилизованного белка определяют по разности между общим количеством белка, использованным для иммобилизации, и количеством белка, оставшимся в растворе после проведения иммобилизации. Однако этот косвенный метод определения недостаточно надежен, поскольку часть белка оканчивается неучтенной в результате неспецифического связывания или адсорбции; кроме того, может происходить инактивация как иммобилизованного, так и свободного белка.

5.3.1 Определение концентрации белка

Большинство методов определения концентрации белка (буретовая реакция, методы Лоури и Брэдфорд) построены по од-

ному принципу: белок из раствора осаждают и растворяют вновь для проведения цветной реакции. В случае иммобилизованных белков такой подход нельзя реализовать напрямую. В некоторых случаях, например при иммобилизации за счет адсорбции, белок может быть отсоединен от носителя. Можно использовать протеолитическое расщепление, а также кислотный или щелочной гидролиз, однако следует учитывать, что при неполном отщеплении белка не весь иммобилизованный белок будет измерен. Специальные методы определения концентрации иммобилизованных белков (с бичинхониновой кислотой, с нингидрином, а также метод Брэдфорд) описаны в разд. 3.8.1.

5.3.2 Определение ферментативной активности

Для определения ферментативной активности иммобилизованного фермента не рекомендуется отделять фермент от матрицы, даже в случае адсорбции, когда фермент можно перевести в раствор просто путем повышения ионной силы, поскольку фиксация фермента на твердом носителе может значительно изменять его активность. Поэтому эксперимент должен быть поставлен таким образом, чтобы можно было измерять активность именно иммобилизованного фермента. Для определения активности растворимых ферментов лучше всего пользоваться такими методами, которые позволяют непрерывно следить за ходом реакции, например оптическими методами детекции. Перенос такой методологии на иммобилизованные ферменты достаточно сложен, поскольку иммобилизованные ферменты невозможно равномерно распределить в реакционной среде. Кроме того, из-за наличия в растворе твердой матрицы изменяется ход светового луча. Ниже представлено несколько возможных способов адаптации оптических методов для определения активности иммобилизованных ферментов, а также рассмотрены другие подходы к определению ферментативной активности.

5.3.2.1 МОДИФИКАЦИЯ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Для непрерывного анализа, применяемого, например, для определения активности лактатдегидрогеназы или трипсина, навеску иммобилизованного на носителе фермента добавляют в реакционную среду, содержащую буфер, субстраты и кофакторы. Смесь необходимо постоянно перемешивать, вращая или встряхивая, чтобы обеспечить постоянный обмен субстратов и

продуктов у поверхности фермента и избежать образования зон с их недостаточной или избыточной концентрацией. Сосуд с реакционной смесью необходимо поместить в водяную баню или в термостат для поддержания постоянной температуры. При перемешивании измерение производить невозможно, поскольку твердые частицы носителя могут перекрывать путь светового луча. Если частицы с иммобилизованным ферментом тяжелые и быстро осаждаются на дно сосуда, как, например, стеклянные шарики, перемешивание останавливают и измеряют поглощение супернатанта либо в самом сосуде, либо путем переноса части жидкости в отдельную кювету. После проведения измерения образец необходимо полностью перенести обратно в реакционный сосуд, чтобы объем реакционной смеси сохранялся постоянным. Время измерения должно быть кратким, чтобы не сильно влиять на общий ход реакции. С этой же целью предпочтительно использовать большой общий объем реакционной смеси и отбирать для измерения пробу сравнительно небольшого объема.

Если быстрое разделение носителя с ферментом и реакционной среды невозможно, отобранную пробу следует быстро отфильтровать или осадить центрифугированием. Опять же после проведения измерения как супернатант, так и осадок необходимо вернуть в общую смесь. Если это невозможно, например, из-за образования агрегатов осадка, следует параллельно ставить несколько одинаковых экспериментов, чтобы иметь возможность отбирать пробы на всем протяжении реакции. Кроме того, следует учесть, что распределение фермента на поверхности носителя может быть неравномерным, поэтому различные образцы могут давать различающиеся результаты.

Таким образом, при такой постановке эксперимента непрерывно следить за ходом реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, не представляется возможным; возможно только осуществлять отбор проб реакционной смеси через определенные временные интервалы. При большом числе таких временных интервалов ход реакции можно определить с достаточно высокой точностью. Для непрерывного слежения за ходом реакции используют биореакторы. Несколько типов таких реакторов описано в разд. 5.4. Для определения ферментативной активности носитель с иммобилизованным ферментом помещают в цилиндр, закрытый снизу и сверху мембраной, проницаемой для реакционной среды (рис. 5.10). Поскольку ферменты иммобилизованы на довольно крупных твердых частицах, для их удержания достаточно обычных фильтров. В одном варианте реакционная среда в реакторе постоянно перемешивается, а в

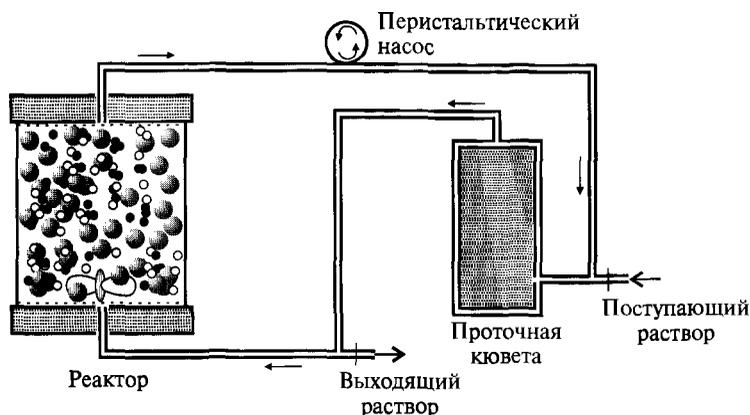


Рис. 5.10. Ферментный реактор для непрерывного слежения за скоростью реакции. Большие кружки — фермент, маленькие белые кружки — субстрат, маленькие черные кружки — продукт

другом варианте частицы носителя с ферментом плотно упакованы, как в хроматографической колонке. Реакционную среду непрерывно пропускают через реактор в циклическом режиме; выходящая из реактора жидкость перед возвращением в реактор проходит через фотометрическую кювету. Система заполняется и опорожняется с помощью клапанов, устроенных таким образом, что сначала через кювету проходит новая среда, которая служит в качестве раствора сравнения. В системе не должно быть пузырьков воздуха, которые могли бы попасть в кювету и помешать измерению. Для определения ферментативной активности необходимо знать объем реакционной смеси. Объем реакционной смеси определяется только объемом реактора (за вычетом объема носителя), а объем соединительных трубок и кюветы следует учесть для определения разбавления. Объем фермента (который для растворимых ферментов измеряется в микролитрах) в случае иммобилизованных ферментов определить сложно, поскольку он зависит от формы и структуры носителя, поэтому его выражают через количество носителя (например, в пересчете на сухой вес носителя, его доступную площадь поверхности и т. д.).

5.3.2.2 КОФАКТОРЫ В РЕАКЦИЯХ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

Многие ферментативные реакции протекают с участием кофакторов. Если кофактор связан ковалентной или другой проч-

ной связью с ферментом, как пиридоксальфосфат, порфирин или ФАД, он оказывается иммобилизован на носителе вместе с ферментом. Однако слабосвязанные кофакторы, такие как НАД, НАДФ, АТФ, тиаминдифосфат или ионы металлов, в процессе реакции теряются, а ввиду их высокой стоимости это невозможно не учитывать; особенно это касается косубстратов, которые расходуются в тех же количествах, что и субстраты. Кроме того, такие вещества загрязняют продукты реакции. Следовательно, регенерация кофакторов — важный аспект в технологическом процессе с использованием иммобилизованных ферментов. Кофакторы типа НАД или АТФ можно иммобилизовать путем ковалентного присоединения к полимерным носителям, таким как полиэтиленгликоль или декстран.

Системы регенерации предназначены для рецикла кофакторов, претерпевающих превращения в ходе реакции. Такой системой, в частности, является система регенерации НАДН из НАД с участием формилдегидрогеназы. В других системах регенерации задействованы алкогольдегидрогеназа или глутаматдегидрогеназа. АТФ можно регенерировать из АДФ с помощью ацетаткиназы при использовании ацетилфосфата в качестве субстрата.

Литература

- Bickerstaff, G.F. (1997) *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, Totowa, NJ
- Chenault, H. K. and Whitesides, G. M. (1987) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14, 147
- Drauz, K. and Waldmann, H. (1995) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. VCH, Weinheim
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., and Wandrey, C. (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 52, 309-319
- Kula, M.-R. and Wandrey, C. (1987) *Meth. Enzymology* 136, 9-21
- Mosbach, K., ed. (1987) *Meth. Enzymol.* 135-137
- Rehm, H.-J. and Reed, G. (1995) *Enzymes, Biomass, Food and Feed*, vol. 9, VCH, Weinheim
- Taylor, R.F. (1991) *Protein Immobilization*, Marcel Dekker, New York
- Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E., and Goldstein, L. (1976) *Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 1, Immobilized Enzymes Principles*, Academic Press, New York
- Woodward, J. (1985) *Immobilized Cells and Enzymes*. IRL Press, Oxford

5.4 БИОРЕАКТОРЫ

Для технического использования в крупномасштабных процессах иммобилизованные ферменты должны находиться в подходящей форме. Такие специализированные системы называют общим термином *ферментные реакторы* или *биореакторы*, однако

последний термин чуть шире — он включает в себя также реакторы, работающие на иммобилизованных клетках (см. разд. 5.4.4). В ферментных реакторах реакция и контроль за ней осуществляются в непрерывном режиме (рис. 5.11). В реакторе создаются оптимальные условия для поддержания фермента в активной форме при непрерывной подаче субстрата и эффективном удалении продукта, чтобы не допустить ингибирования активности фермента. Превращение субстрата должно быть количественным (конечно, если позволяет равновесие реакции). Ход процесса зависит от типа реактора, количества активного фермента в реакторе и скорости потока. Таким образом, в реакторах должны создаваться оптимальные условия для протекания каталитической реакции, и в то же время система должна постоянно снабжаться всеми необходимыми компонентами. Каталитическая реакция, ход которой зависит от количества фермента и других компонентов в системе, может быть, вообще говоря, масштабирована до любого объема, однако подача компонентов в систему зависит от размеров реактора. Введение субстратов, удаление продуктов и даже поддержание постоянной температуры напрямую связаны с объемом реактора и влияют на выбор типа и размера реактора для решения конкретной задачи.

Устройство ферментного реактора зависит от конкретного фермента и характера реакции. Среди множества типов и модификаций реакторов выделим три основных типа.

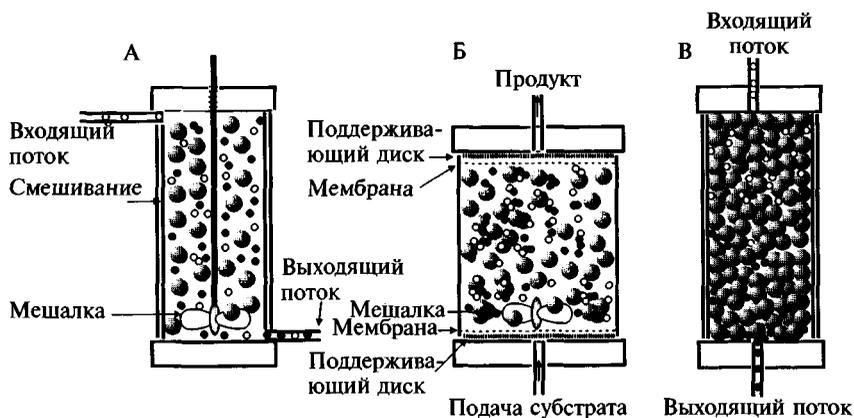


Рис. 5.11. Основные типы ферментных реакторов: А — реактор периодического действия, Б — мембранный реактор, В — реактор с неподвижным слоем. Большие кружки — фермент, маленькие белые кружки — субстрат, маленькие черные кружки — продукт

5.4.1 Реактор периодического действия

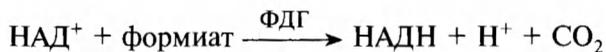
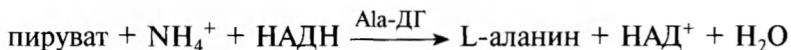
Реактор периодического действия — это простейший тип ферментного реактора, который можно рассматривать как обычный реакционный сосуд, увеличенный до необходимых размеров (рис. 5.11,А). Для достижения оптимального взаимодействия между ферментом и субстратом необходимо поддерживать определенную температуру и осуществлять непрерывное перемешивание. Однако в реакторе данного типа не решена проблема непрерывной подачи субстрата и удаления продукта, поэтому ведение непрерывного процесса в реакторе такого типа практически невозможно. Вместо этого реакцию в объеме реактора проводят какое-то определенное время, а затем ее останавливают и отделяют продукт. Преимущество такого подхода состоит в том, что оптимальные условия реакции устанавливаются сразу, а за ходом реакции можно следить в непрерывном режиме — либо путем отбора проб, либо с помощью встроенных датчиков.

5.4.2 Мембранный реактор

Мембранный реактор можно рассматривать как дальнейшую модификацию реактора периодического действия (рис. 5.11,Б). Мембрана проницаема только для субстратов и продуктов, но непроницаема для фермента. Преимущества такого подхода очевидны: нет нужды осуществлять трудоемкую процедуру иммобилизации фермента с возможным риском потери активности, фермент можно использовать в любой желаемой концентрации, а субстрат и продукт можно вводить и выводить соответственно в непрерывном режиме. Однако следует учесть, что скорость подачи жидкости через мембрану ограничена. Кроме того, мембрана может забиваться в ходе процесса, несмотря на перемешивание, а нарушение целостности мембраны ведет к утечке фермента. Таким образом, для удешевления и упрощения процесса используют все же иммобилизованный фермент (например, заключенный в капсулы или с перекрестными сшивками между молекулами самого фермента или между молекулами фермента и инертного носителя типа БСА), что увеличивает размер частиц фермента и позволяет заменить мембраны для ультрафильтрации более грубыми фильтрами.

Мембранные реакторы могут оказаться удобными для работы с полиферментными системами, особенно в случае сопряжен-

ных реакций с регенерацией кофакторов. Так, при сопряжении реакции, катализируемой дегидрогеназой аминокислот, например аланиндегидрогеназой (А1а-ДГ), с реакцией с участием формиатдегидрогеназы (ФДГ) можно добиться регенерации образовавшегося НАД⁺:



Необходимо предотвратить выведение НАДН из реактора. Для этого можно осуществить его ковалентное связывание с полиэтиленгликолем.

Мембранные реакторы также используются для осуществления ферментативного катализа в двухфазных системах. В подобных случаях мембрана служит границей раздела водной и органической фазы.

Использование полых волокон вместо мембран повышает эффективность работы мембранных реакторов. Большая площадь поверхности полых волокон облегчает обмен с внешней средой, в частности удаление продукта.

5.4.3 Реактор с неподвижным слоем

Этот тип реакторов можно рассматривать как дальнейшую модификацию мембранных реакторов, в которых фермент иммобилизован на твердом носителе типа стекла, декстрана или целлюлозы (рис. 5.11,В). Носитель упакован в реакторе, как в хроматографической колонке. При элюировании раствором субстрата фермент выступает в роли стационарной фазы, а раствор субстрата — в роли подвижной фазы. Реакция протекает при прохождении субстрата через слой иммобилизованного фермента в реакторе. Для иммобилизации подходит большинство перечисленных выше методов — адсорбция, ковалентное связывание или образование перекрестных сшивок. Однако следует избегать адсорбции на носителе компонентов реакционной смеси; в противном случае время от времени приходится производить регенерацию носителя. В этой связи определенное преимущество имеет связывание фермента с носителем просто за счет адсорбции, поскольку при регенерации носителя фермент смывается вместе с остальными веществами и заменяется на новый, а сам носитель остается упакованным в реакторе.

Параметры реакционного процесса, протекающего в реакторе с неподвижным слоем, а именно размеры реактора, толщина слоя носителя, скорость элюирования и температура должны быть тщательно определены и адаптированы для конкретных целей, чтобы при прохождении раствора субстрата через слой носителя с ферментом субстрат полностью превращался в продукт.

5.4.4 Имобилизованные клетки

В промышленных процессах предпочтение отдается использованию не очищенных иммобилизованных ферментов, а целых иммобилизованных клеток. Это позволяет избежать трудоемкой процедуры очистки фермента и продлить срок службы фермента. Если используются нежизнеспособные клетки, при проведении реакции нет необходимости подавать питательную среду. С другой стороны, живые клетки сохраняют свой метаболизм и, следовательно, обладают определенной ферментативной активностью на всем протяжении жизни. Если в производственном процессе требуется проведение лишь одной ферментативной реакции, можно использовать покоящиеся клетки и поддерживать только конкретную интересующую реакцию. Примером является превращение глюкозы во фруктозу под действием глюкозоизомеразы. Процесс можно осуществлять в периодическом режиме, заменяя время от времени весь катализатор, а также в непрерывном режиме, одновременно внося порции нового катализатора и удаляя отработанный катализатор.

Литература

- Belford, G. (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1047-1066
- Bommarius, A.S. (1993) In *Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing*, Rehm, H.-J., Reed, G., Pihler, A., Stadler, P., Stephanopoulos, G. (eds.) VCH-Verlag, Weinheim, pp. 427-466
- Faber, K. (1995) *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin
- Karkare, S.B. (1991) In *Protein Immobilization*, Taylor, R.F. (ed.) Marcel Dekker, New York, pp. 319-337
- Moo-Young, M. (1988) *Bioreactors, Immobilized Enzymes and Cells*, Elsevier, London

5.5 БИОСЕНСОРЫ

5.5.1 Ферментные электроды

Биосенсоры соединяют в себе специфичность ферментов или других биологических молекул с системой передачи сигнала, состоящей из электрических и оптических элементов. Биосенсор

может быть специфичным по отношению к субстрату, продукту или эффектору (ингибитору или активатору) данной реакции. Аналогично тому подходу, который используется для определения ферментативной активности, биосенсор детектирует один из компонентов системы, преимущественно продукт, а для анализа определенных процессов часто применяют системы сопряженных реакций.

Один из вариантов биосенсора — электрод с иммобилизованным ферментом (рис. 5.12). Для создания такого электрода фермент иммобилизуют на поверхности электрохимического датчика. Субстрат проходит через селективную мембрану и достигает слоя фермента, где превращается в продукт, который регистрируется потенциометрическим или амперометрическим способом. В случае потенциометрического сенсора измеряется разность потенциалов между анализируемым раствором, омывающим слой фермента, и внутренним раствором, заполняющим электрод. Потенциал должен быть пропорционален логарифму концентрации анализируемого вещества. Потенциометрические биосенсоры — это ионоселективные электроды, соединенные с подходящим электродом сравнения; они позволяют осуществлять

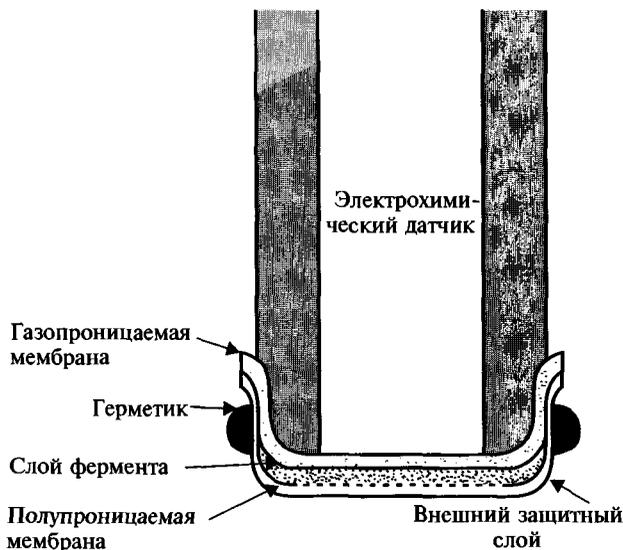


Рис. 5.12. Схема устройства ферментного электрода [Rompp Lexikon, Biotechnology, 1992, p. 254, с разрешения Thieme Verlag Stuttgart]

мониторинг таких ионов, как NH_4^+ , CN^- или S^{2-} , а наиболее распространенным ионоселективным электродом является Нечувствительный электрод, применяемый для определения рН.

Амперометрические преобразователи регистрируют электрический ток между рабочим электродом и электродом сравнения и позволяют получать линейную зависимость от концентрации субстрата. Одним из первых селективных электродов был кислородный электрод (Clark and Lyons, 1962). Субстрат или продукт должны окисляться или восстанавливаться на поверхности электрода. В систему могут вводиться восстановительные медиаторы, такие как феррицианид, синь Мелдола или феназинметосульфат. Электрод позволяет регистрировать изменения, происходящие во времени и выраженные в микроамперах или милливольтках.

Принципы иммобилизации фермента на поверхности электрода в общих чертах те же, что описаны выше. Фермент может быть заключен в гель, предпочтительно полиакриламидный, но также желатиновый или крахмальный, или ковалентно связан с матрицей. Включение в гель — это мягкий способ иммобилизации, однако он подходит только для небольших субстратов, способных проникать сквозь сеть геля. Один из важных примеров — глюкозооксидазный электрод для определения содержания глюкозы в крови. Заключенный в гель фермент реагирует с глюкозой и кислородом, в результате чего образуется пероксид водорода и глюконовая кислота, поэтому этот электрод комбинируют с кислородным электродом. Среди других примеров — ацетилхолинэстераза и уреаза, совмещенные с рН-электродом. Ферменты в таких системах работают достаточно долго — несколько месяцев. Поскольку гели, подобные полиакриламидному гелю, не проводят электричество, для облегчения переноса электронов в гель включают мелкие частицы графита и ферроцен (Lange et al., 1985). В альтернативном варианте используют проводящие полимеры типа полипиррола.

В другом распространенном варианте биосенсора используют ковалентную иммобилизацию фермента на носителе, который в свою очередь фиксируется на поверхности сенсора. Такие ферменты, как глюкозооксидаза, уреаза, аскорбатоксидаза и лактатоксидаза, иммобилизуют на нейлоне через остаток лизина, используя в качестве спейсера глутаровый альдегид. Также находят применение коллагеновые мембраны.

Непосредственное связывание фермента с поверхностью электрода обеспечивает малое время отклика. Ферменты могут быть

присоединены как за счет нековалентной адсорбции (недостаток — нестабильность связывания), так и за счет ковалентного взаимодействия. В последнем случае поверхность электрода должна быть активирована путем химического или электрохимического окисления, что позволяет получать реакционноспособные группы, например, карбоксильные или фенольные. Еще один вариант активации — силанизация поверхности электрода. Фермент присоединяется к поверхности с помощью глутарового альдегида или карбодиимида. Электроды с ферментами, иммобилизованными напрямую, сохраняют активность на протяжении нескольких недель.

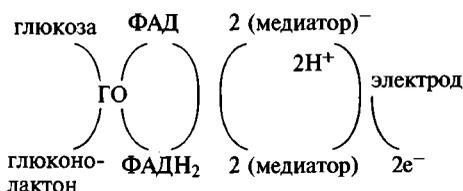
В потенциометрических сенсорах применяются селективные электроды для определения ионов F^- , Cl^- , S^{2-} , NH_4^+ и H^+ . Например, при окислении глюкозы кислородом при участии глюкозооксидазы образуется пероксид водорода, который окисляет иодид до иода. Также используют иммобилизованную пероксидазу, уреазу и каталазу. Амперометрические сенсоры обладают высокой чувствительностью. В биосенсорах нередко применяются вспомогательные платиновые электроды.

Обычно биосенсор имеет две мембраны. Внешняя мембрана защищает слой фермента от внешней среды. Эта мембрана должна быть проницаемой для субстратов и продуктов ферментативной реакции. Прямой контакт с электродом осуществляется посредством внутренней мембраны, проницаемой только для таких компонентов, как кислород, но непроницаемой для других электрически активных веществ (мочевой кислоты, аскорбиновой кислоты и др.). Таким образом, в биосенсоре реализуется определенная последовательность событий: субстрат диффундирует в слой фермента, где превращается в продукт, который проникает сквозь внутреннюю мембрану и реагирует с поверхностью электрода.

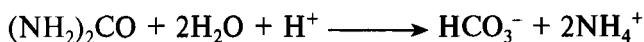
Для определения глюкозы с помощью глюкозооксидазы (ГО) в соответствии с реакцией



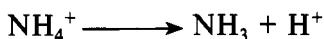
обычно используют платиновые электроды, регистрирующие либо расход кислорода на катоде, либо образование пероксида водорода на аноде. Для регенерации ФАДН₂ используют медиаторы типа феррицианида или ферроцена, которые реагируют напрямую с электродом и предотвращают инактивацию фермента под действием пероксида водорода:



Селективный электрод для определения аммония используется для слежения за ходом катализируемой уреазой реакции, в частности в моче и сыворотке:

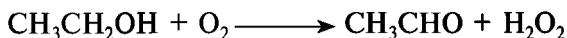


Определению мешает присутствие ионов калия и натрия. Поэтому для определения концентрации аммиака лучше использовать потенциометрический газоселективный электрод:



Такой электрод позволяет проводить определение в диапазоне концентраций аммиака от 1 мкМ до 30 мМ. Также используются рН-электроды с тонким слоем иммобилизованной уреазы.

Реакция, катализируемая алкогольоксидазой:



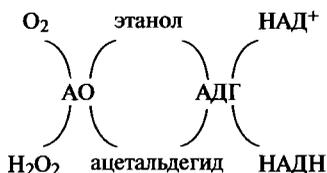
используется для определения концентрации этанола и других спиртов амперометрическим способом по расходованию кислорода или по образованию пероксида водорода. Чувствительность таких электродов, например, при определении уровня спирта в крови колеблется от 0,4 до 50 мг спирта в 100 мл.

Алкогольдегидрогеназу (АДГ), лактатдегидрогеназу или малатдегидрогеназу иммобилизуют на поверхности платинового электрода. Фермент вместе с кофактором (НАД^+) связаны с электродом и окружены ацелированной диализной мембраной. Под действием субстрата соответствующей дегидрогеназы НАД^+ восстанавливается до НАДН , который вновь окисляется на аноде:



Высокоспецифичный биосенсор для определения этанола был получен в результате комбинации алкогольдегидрогеназы, превращающей ацетальдегид в этиловый спирт, и алкогольоксидазы

(АО), окисляющей этанол при поглощении кислорода; в данном случае измеряют потребление кислорода:

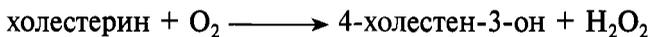


Лактат в сыворотке крови или в продуктах питания удается определять в концентрации от 1 мкМ до 5 мМ. На аноде определяют количество НАДН, образующегося под действием лактатдегидрогеназы. Эту же систему можно приспособить для определения пирувата (например, в спинномозговой жидкости). В альтернативном варианте определяют расход кислорода или образование пероксида водорода в реакции, катализируемой лактатоксидазой. Цитохром-зависимая лактатдегидрогеназа (ЛДГ) взаимодействует с феррицианидом, являющимся акцептором электронов, в результате чего образуется ферроцианид, который определяют амперометрическим или потенциометрическим методом.

Среди других ферментных электродов можно назвать электрод для определения уратов (с помощью уриказы; диапазон измерений от 10 мкМ до 100 мМ), оксалатов в моче (с помощью оксалатдекарбоксилазы или оксалатоксидазы; диапазон измерений от 0,2 до 10 мМ). Креатинин (продукт разложения креатина) в сыворотке крови определяют с помощью сенсора с иммобилизованной креатининиминогидролазой:

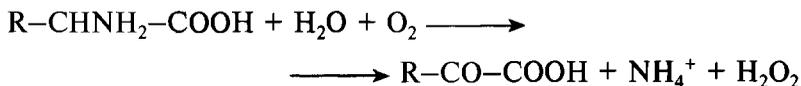


При этом используют биосенсор на газообразный аммиак, чувствительность которого колеблется в пределах 1-100 мг на 100 мл. Для определения холестерина измеряют потребление кислорода с помощью кислородного электрода с иммобилизованной холестеролоксидазой:



В образцах плазмы крови диапазон измеряемых концентраций составляет от 0,1 мкМ до 8 мМ. Аскорбат (например, во фруктовых соках) можно определять с помощью аскорбатоксидазы, иммобилизованной на кислородном электроде. Диапазон измерений — от 4 мкМ до 0,7 мМ. Различные аминокислоты

селективно определяют с помощью соответствующих оксидаз аминокислот:



Соответствующий фермент иммобилизуют на кислородном электроде. Также используют селективный электрод для определения аммиака.

Платиновые электроды с иммобилизованной ацетилхолинэстеразой и холиноксидазой служат для определения ацетилхолина и холина с чувствительностью 1-10 мкМ.

Литература

- Koncki, R., Leszczynski, P., Hulanicki, A., and Gab, S. (1992) *Anal. Chim. Acta* 257, 67-72
- Lange, M.A. and Chambers, J.Q. (1985) *Anal. Chim. Acta* 175, 89-97
- Mascini, M., Iannello, M., and Palleschi, G. (1983) *Anal. Chim. Acta* 146, 135-148
- Clark, J.L.C., Lyons, C. (1962) *Ann. NY Acad. Sci* 102, 29—45

5.5.2 Иммуные сенсоры

Данный метод основан на высоком сродстве антигенов и антител. Фермент связывают с антителом или с антигеном. Антитела, иммобилизованные на передающей сигнал поверхности мембраны, должны быть ориентированы таким образом, чтобы связывание происходило через Fc-фрагмент, а Fab-фрагмент был бы направлен в сторону от этой поверхности; это достигается путем окисления углеводных остатков Fc-фрагмента периодатом или путем нанесения на передающую поверхность мембраны белка А, с которым затем связывается Fc-фрагмент антител.

Для повторного использования иммунного сенсора следует нарушить взаимодействие антигенов с антителами. Для этого применяют хаотропные агенты — мочевины, MgCl_2 , KCl — в высокой концентрации. Такое воздействие может ухудшить характеристики сенсора, в частности, его время отклика и чувствительность, особенно это относится к непрямым сенсорам.

Примером иммунного сенсора может служить система специфических антител против человеческого хорионического гонадотропина (чХГ), связанных с электродом с помощью бромциана. При связывании чХГ потенциал электрода сдвигается в положительном направлении.

5.5.3 Другие типы биосенсоров

Кроме электродов, существуют и другие типы сенсоров. Одним из принципов, лежащих в основе действия сенсоров, является определение теплового эффекта реакции. Используют полупроводниковый термочувствительный резистор (термистор), способный улавливать изменение температуры на $0,01\text{ }^{\circ}\text{C}$. Также используют термопары. Следует учесть, что температурные изменения иногда возникают по неспецифическим причинам, так что предварительно следует установить наличие строгой зависимости температуры реакционной смеси от хода реакции.

Оптические сенсоры, основанные на использовании оптических волокон, применяются для различных типов анализа, в частности, для мониторинга изменений pO_2 , pCO_2 или pH.

Полевые транзисторы позволяют следить за изменениями на поверхности раздела металла и полупроводника. Два электрода (проводники «-типа), называемые истоком и стоком, разделены полупроводниковым каналом (p-типа), обычно сделанным из оксида металла. Между истоком и стоком подается разность потенциалов. В ферментном сенсоре на основе такого транзистора (рис. 5.13) вместо оксида металла используется ионочувствительный слой с иммобилизованным ферментом. Образующиеся или потребляемые в ходе ферментативной реакции ионы индуцируют электрический ток в канале и изменяют напряжение между стоком и истоком.

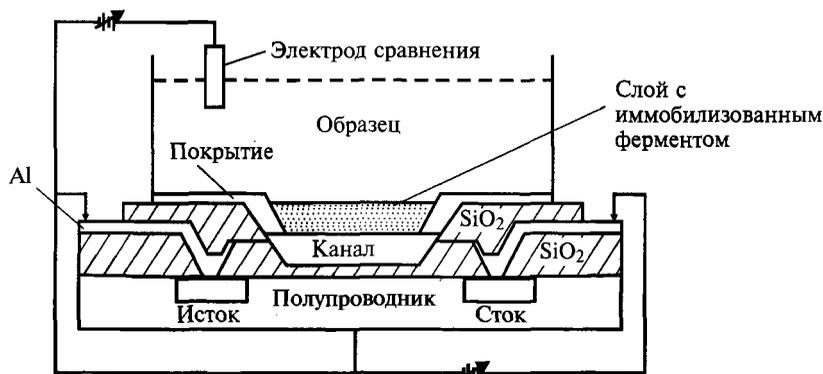


Рис. 5.13. Схема ферментного сенсора на основе полевого транзистора [Buchholz, K., Kasche, V. (1997) Biokatalysatoren und Enzymtechnologie, VCH, Weinheim]

5.5.4 Биоаффинные сенсоры

Сенсоры такого типа позволяют непосредственно анализировать связывание. Процесс связывания изменяет показания прибора. Для анализа можно использовать антитела, а также такие системы, как авидин, реагирующий с биотином, конканавалин А, связывающийся с олигосахаридами, белок А, взаимодействующий с IgG через Fc-фрагмент, и различные рецепторные молекулы, взаимодействующие со своими лигандами. Белки иммобилизуют на платиновом или ионоселективном электроде и регистрируют изменение потенциала, происходящее при связывании лиганда. В основе таких сенсоров также могут быть полевые транзисторы, пьезоэлектрические кристаллы или оптические волокна. Мембранные рецепторы, например ацетилхолиновый рецептор, при иммобилизации на передающем устройстве должны быть стабилизированы путем включения в искусственную мембрану, такую как липидный слой или везикула.

Литература

- Eggins, B. (1996) *Biosensors: An Introduction*. Wiley & Teubner, Chichester
- Guilbault, G.G., Kauffmann, J.-M., and Partriarch, G.J. (1991) In *Protein Immobilization*, R.F. Taylor (ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 209-262
- Mattiasson, B. (1991) In *Biotechnology*, Rehm, H.-J., Reed, G. (eds.), 2d edn. Vol. 4, VCH, Weinheim
- Taylor, R.F. (1991) In *Protein Immobilization*, R.F. Taylor (ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 263-303

5.6 ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ В МЕДИЦИНЕ

Иммобилизованные ферменты все шире применяются в медицинских целях. Для лечения врожденной ферментной недостаточности могут применяться ферменты, заключенные в микрокапсулы. Одним из первых шагов в этом направлении было проведение заместительной терапии у мышей, не имевших фермента каталазы. Использование микрокапсулированных препаратов имеет дополнительное преимущество, заключающееся в снижении риска возникновения иммунных реакций (Chang & Poznansky, 1968). Для получения капсул можно использовать липосомы, а также красные кровяные клетки после гемолиза и восстановления мембраны. Например, в такой форме р-галактозидаза использовалась для лечения болезни Гоше. Фенилаланин—аммиак-лиаза, включенная в искусственные клетки, использовалась для лечения фенилкетонурии у крыс. Аспарагиназа

использовалась для разрушения аминокислоты, требующейся для роста опухолевых клеток. Для преодоления иммуногенности и токсичности фермент вводили в форме микрокапсул. Дополнительные модификации, такие как дезаминирование, ацетилирование или конъюгация с полиаминокислотами увеличивают время жизни фермента и также снижают его иммуногенность. Включенная в искусственные клетки уреазы разлагает мочевину и высвобождает аммиак, который, однако, необходимо удалять либо с помощью адсорбентов, либо путем превращения в аминокислоту при участии полиферментного комплекса, также включенного в искусственные клетки и состоящего из уреазы, глутаматдегидрогеназы, глюкозодегидрогеназы (для регенерации кофакторов) и трансаминазы. Кофакторы (НАДН и НАДФН) удерживаются внутри искусственных клеток полимерной липидной мембраной или за счет ковалентного присоединения к декстрану. Для лечения сахарного диабета применяют микрокапсулы с островковыми клетками, которые секретируют инсулин, необходимый для поддержания нормального уровня глюкозы в крови. При нарушении работы печени, например при циррозе печени, с помощью содержащих тирозиназу искусственных клеток удается снижать уровень тирозина.

Литература

- Chang, T.M.S. (1977) *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*. Plenum Press, New York
- Chang, T.M.S. (1991) In *Protein Immobilization*, R.F. Taylor (ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 305-318
- Chang, T.M.S. and Poznansky, M. J. (1968) *Nature* 218, 242-245
- Holcenbeig, J.S., Roberts, J., eds. (1981) *Enzymes as Drugs*, Wiley-Interscience, New York

ПРИЛОЖЕНИЕ

СПИСОК ФЕРМЕНТОВ В СООТВЕТСТВИИ С ИХ МЕЖДУНАРОДНОЙ КЛАССИФИКАЦИЕЙ (КФ)

- 1 Оксидоредуктазы
- 1.1 Действующие на СН-ОН группу донора
 - 1.1.1 С НАД⁺или НАДФ⁺в качестве акцептора
 - 1.1.1.1 Алкогольдегидрогеназа, алкоголь: НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.27 L-лактатдегидрогеназа, L-лактат: НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.28 D-лактатдегидрогеназа, D-лактат: НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.29 Глицератдегидрогеназа, D-глицерат: НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.37 Малатдегидрогеназа, Б-малат:НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.38 Малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая оксалоацетат), Б-малат:НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.41 Изоцитратдегидрогеназа (НАД⁺), изоцитрат: НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.1.1.42 Изоцитратдегидрогеназа (НАДФ⁺), изоцитрат: НАД⁺ оксидоредуктаза (декарбоксилирующая)
 - 1.1.1.44 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа, 6-фосфо-0-глюконат:НАДФ⁺ 2-оксидоредуктаза
 - 1.1.1.47 Глюкозо-1-дегидрогеназа, р-D-глюкоза: НАД(Ф)⁺ 1-оксидоредуктаза
 - 1.1.1.49 Глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа, 0-глюкозо-6-фосфат:НАДФ⁺ 1-оксидоредуктаза
 - 1.1.2 С цитохромом в качестве акцептора
 - 1.1.2.3 L-Лактатдегидрогеназа (цитохром), (Б)-лактат:феррицитохром-с₂ оксидоредуктаза
 - 1.1.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.1.3.4 Глюкозооксидаза, р-0-глюкоза:кислород 1 -оксидоредуктаза
 - 1.1.3.5 Гексозооксидаза, 0-гексоза:кислород 1 -оксидоредуктаза

- 1.1.3.22 Ксантиноксидаза, ксантин:кислород оксидоредуктаза
- 1.1.4 С дисульфидом в качестве акцептора
- 1.1.5 С хинином или его аналогами в качестве акцептора
- 1.1.99 С другими акцепторами
- 1.2 Действующие на альдегидную или оксогруппу донора
 - 1.2.1 С НАД¹ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.2.1.2 Формиатдегидрогеназа, формиат:НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.2.1.3 Альдегиддегидрогеназа (НАД⁺), альдегид:НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.2.1.12 Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, 0-глицеральдегид-3-фосфат:НАД⁺ оксидоредуктаза (фосфорилирующая)
 - 1.2.2 С цитохромом в качестве акцептора
 - 1.2.2.2 Пируватдегидрогеназа (цитохром), пируват:феррицитохром-ft, оксидоредуктаза
 - 1.2.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.2.3.3 Пируватоксидаза, пируват:кислород 2-оксидоредуктаза (фосфорилирующая)
 - 1.2.3.4 Оксалатоксидаза, оксалат:кислород оксидоредуктаза
 - 1.2.4 С дисульфидом в качестве акцептора
 - 1.2.4.1 Пируватдегидрогеназа (липоамид), пируват:липоамид 2-оксидоредуктаза (декарбоксилирующая и акцептор-ацетилирующая)
 - 1.2.4.2 Оксоглутаратдегидрогеназа (липоамид), 2-оксоглутарат:липоамид 2-оксидоредуктаза
 - 1.2.4.4 2-Оксоизовалериана дегидрогеназа (липоамид), дегидрогеназа разветвленных α -кетокислот, 2-оксоизовалерианат:липоамид 2-оксидоредуктаза (декарбоксилирующая и акцептор-ацетилирующая)
 - 1.2.7 С железосерным белком в качестве акцептора
 - 1.2.7.1 Пируватсинтаза, пируват:ферредоксин 2-оксидоредуктаза (КоА-ацетилирующая)
 - 1.2.99 С другими акцепторами
 - 1.2.99.2 СО-дегидрогеназа, монооксид углерода: (акцептор) — оксидоредуктаза
- 1.3 Действующие на СН-СН группу донора
 - 1.3.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора

- 1.3.1.6 Фумаратредуктаза (НАДН), сукцинат: НАД⁺ оксидоредуктаза
- 1.3.1.8 Ацил-КоА дегидрогеназа (НАДФ⁺), ацил-КоА:НАДФ⁺ 2-оксидоредуктаза
- 1.3.2 С цитохромом в качестве акцептора
- 1.3.3 С кислородом в качестве акцептора
- 1.3.5 С хиноном или его аналогами в качестве акцептора
 - 1.3.5.1 Сукцинатдегидрогеназа (убихинон), сукцинат:убихинон оксидоредуктаза
- 1.3.7 С железосерным белком в качестве акцептора
- 1.3.99 С другими акцепторами
 - 1.3.99.3 Ацил-КоА—дегидрогеназа, ацил-КоА: (акцептор) 2,3-оксидоредуктаза
- 1.4 Действующие на СН-NH₂ группу донора
 - 1.4.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.4.1.1 Аланиндегидрогеназа, β-аланин:НАД⁺ оксидоредуктаза (дезаминирующая)
 - 1.4.1.2 Глутаматдегидрогеназа, L-глутамат: НАД⁺ оксидоредуктаза (дезаминирующая)
 - 1.4.1.14 Глутаматсинтаза (НАДН), L-глутамат: НАД⁺ оксидоредуктаза (трансаминирующая)
 - 1.4.2 С цитохромом в качестве акцептора
 - 1.4.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.4.3.2 Оксидаза L-аминокислот, L-аминокислота:кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая)
 - 1.4.3.4 Аминоксидаза (флавинсодержащая), амин:кислород оксидоредуктаза (флавинсодержащая) (дезаминирующая)
 - 1.4.3.6 Аминоксидаза (медьсодержащая), амин:кислород оксидоредуктаза (медьсодержащая) (дезаминирующая)
 - 1.4.4 С дисульфидом в качестве акцептора
 - 1.4.4.2 Глициндегидрогеназа, глицин:липоилпротеин оксидоредуктаза (декарбоксилирующая и вводящая аминотильную группу в акцептор)
 - 1.4.7 С железосерным белком в качестве акцептора
 - 1.4.99 С другими акцепторами
- 1.5 Действующие на СН-NH группу донора
 - 1.5.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.5.1.3 Дигидрофолатредуктаза, 5,6,7,8-тетрагидрофолат:НАДФ⁺ оксидоредуктаза

- 1.5.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.5.3.11 Полиаминоксидаза, N 1-ацетилспермидин: кислород оксидоредуктаза
- 1.5.4 С дисульфидом в качестве акцептора
- 1.5.5 С хиноном или его аналогами в качестве акцептора
- 1.5.99 С другими акцепторами
- 1.6 Действующие на НАДН или НАДФН
 - 1.6.1 С НАД⁺или НАДФ⁺в качестве акцептора
 - 1.6.2 С гемовым белком в качестве акцептора
 - 1.6.2.2 Цитохром-*b*₅—редуктаза, НАДНгферрицитохром-&sub5 оксидоредуктаза
 - 1.6.4 С дисульфидом в качестве акцептора
 - 1.6.4.2 Глутатионредуктаза (НАД(Ф)Н), НАД(Ф)Н: окисленный глутатион оксидоредуктаза
 - 1.6.4.5 Тиоредоксинредуктаза (НАД(Ф)Н), НАД(Ф)Н: окисленный тиоредоксин оксидоредуктаза
 - 1.6.5 С хиноном или его аналогами в качестве акцептора
 - 1.6.5.3 НАДН—дегидрогеназа (убихинон), НАДН: убихинон оксидоредуктаза
 - 1.6.6 С азотсодержащей группой в качестве акцептора
 - 1.6.6.1 Нитратредуктаза (НАДН), НАДН:нитрат оксидоредуктаза
 - 1.6.8 С флавином в качестве акцептора
 - 1.6.99 С другими акцепторами
 - 1.6.99.3 НАДН-дегидрогеназа, НАДН:(акцептор) оксидоредуктаза
- 1.7 Действующие на другие азотсодержащие соединения в качестве донора
 - 1.7.2 С цитохромом в качестве акцептора
 - 1.7.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.7.5 С хиноном или его аналогами в качестве акцептора
 - 1.7.7 С железосерным белком в качестве акцептора
 - 1.7.99 С другими акцепторами
 - 1.7.99.3 Нитритредуктаза, БЮ:(акцептор) оксидоредуктаза
 - 1.7.99.4 Нитратредуктаза, нитрат:(акцептор) оксидоредуктаза
- 1.8 Действующие на серосодержащую группу донора
 - 1.8.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.8.1.4 Дигидролипоамид-дегидрогеназа, диафораза, дигидролипоамид:НАД⁺ оксидоредуктаза
 - 1.8.2 С цитохромом в качестве акцептора

- 1.8.2.1 Сульфитредуктаза, сульфит:феррици-тохром-с оксидоредуктаза
- 1.8.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.8.3.3 Глутатионоксидаза, глутатион:кислород оксидоредуктаза
- 1.8.4 С дисульфидом в качестве акцептора
 - 1.8.4.2 Протеиндисульфид редукаста (глутатион), глутатион:протеиндисульфид оксидоредуктаза
- 1.8.5 С хиноном или его аналогами в качестве акцептора
- 1.8.7 С железосерным белком в качестве акцептора
- 1.8.99 С другими акцепторами
- 1.9 Действующие на гемовую группу донора
 - 1.9.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.9.6 С азотсодержащей группой в качествеакцептора
 - 1.9.99 С другими акцепторами
- 1.10 Действующие на бифенолы и родственные вещества в качестве доноров
 - 1.10.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.10.2 С гемовым белком в качестве акцептора
 - 1.10.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.10.3.2 Лакказы, и-дифенол:кислород оксидоредуктаза
 - 1.10.3.3 L-Аскорбатоксидаза, L-аскорбат: кислород оксидоредуктаза
 - 1.10.99 С другими акцепторами
- 1.11 С пероксидами в качестве акцепторов
 - 1.11.1.1 НАДН-пероксидаза, НАДН:H₂O₂ оксидоредуктаза
 - 1.11.1.6 Каталаза, H₂O₂: H₂O₂ оксидоредуктаза
 - 1.11.1.7 Пероксидаза, донор:H₂O₂ оксидоредуктаза
 - 1.11.1.9 Глутатионпероксидаза, глутатион:H₂O₂ оксидоредуктаза
- 1.12 Действующие на водород в качестве донора
 - 1.12.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.12.2 С цитохромом в качестве акцептора
 - 1.12.99 С другими акцепторами
- 1.13 Действующие на единственную молекулу донора с присоединением молекулярного кислорода (оксигеназы)
 - 1.13.11 С присоединением двух атомов кислорода
 - 1.13.11.1 Катехол-1,2-диоксигеназа, катехол: кислород 1,2-оксидоредуктаза

- 1.13.11.12 Липоксигеназа, линолеат:кислород оксидоредуктаза
- 1.13.12 С присоединением одного атома кислорода (монооксигеназы или оксигеназы со смешанной функцией)
 - 1.13.12.4 Лактат-2-монооксигеназа, L-лактат: кислород 2-оксидоредуктаза
- 1.13.99 Разные
- 1.14 Действующие на пару молекул доноров с присоединением молекулярного кислорода
 - 1.14.11 С 2-оксоглутаратом в качестве одного донора и с присоединением по одному атому кислорода к обоим донорам
 - 1.14.12 С НАДН или НАДФН в качестве одного донора и с включением двух атомов кислорода в молекулу одного из доноров
 - 1.14.12.1 Антранилат-1,2-диоксигеназа (дезаминирующая, декарбоксилирующая); антранилат, НАД(Ф)Н:кислород оксидоредуктаза (1,2-гидроксилирующая, дезаминирующая, декарбоксилирующая)
 - 1.14.13 С НАДН или НАДФН в качестве одного из доноров и с включением одного атома кислорода
 - 1.14.13.17 Холестерол-7 α -монооксигеназа; холестерин, НАДФН:кислород оксидоредуктаза (7 α -гидроксилирующая)
 - 1.14.14 С восстановленным флавином или флавопротеидом в качестве одного из доноров и с присоединением одного атома кислорода
 - 1.14.14.1 Неспецифическая монооксигеназа, микросомальный P-450; субстрат, восстановленный флавопротеид: кислород оксидоредуктаза (RH-гидроксилирующая или эпоксилирующая)
 - 1.14.15 С восстановленным железосерным белком в качестве одного из доноров и с присоединением одного атома кислорода
 - 1.14.15.4 Стероид-lip-монооксигеназа; стероид, восстановленный адренодоксин:кислород оксидоредуктаза (lip-гидроксилирующая)
 - 1.14.16 С восстановленным птеридином в качестве одного из доноров и с присоединением одного атома кислорода
 - 1.14.16.4 Триптофан-5-монооксигеназа; L-триптофан, тетрагидробиоптерин:кислород оксидоредуктаза (5-гидроксилирующая)

- 1.14.17 С аскорбатом в качестве одного из доноров и с присоединением одного атома кислорода
 - 1.14.17.1 Допамин-1 β -монооксигеназа; 3,4-дигидроксифениламин, аскорбат:кислород оксидоредуктаза (11 р-гидроксилирующая)
- 1.14.99 Разные
 - 1.14.99.5 Стеарил-КоА-десатураза; стеарил-КоА, донор:кислород оксидоредуктаза
- 1.15 Действующие на супероксидный радикал в качестве акцептора
 - 1.15.1.1 Супероксид-дисмутаза, супероксид:супероксид оксидоредуктаза
- 1.16 Окисляющие ионы металлов
 - 1.16.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.16.1.1 Ртуть(II)-редуктаза, Щ:НАДФ⁺ оксидоредуктаза
 - 1.16.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.16.3.1 Ферроксидаза, Fe(II):кислород оксидоредуктаза
- 1.17 Действующие на СН₂ группы
 - 1.17.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.17.3 С кислородом в качестве акцептора
 - 1.17.4 С дисульфидом в качестве акцептора
 - 1.17.99 С другими акцепторами
- 1.18 Действующие на восстановленный ферредоксин в качестве донора
 - 1.18.1 С НАД⁺ или НАДФ⁺ в качестве акцептора
 - 1.18.1.2 Ферредоксин-НАДФ⁺-редуктаза, ферредоксин:НАДФ⁺ оксидоредуктаза
 - 1.18.6 С N₂ в качестве акцептора
 - 1.18.6.1 Нитрогеназа, восстановленный ферредоксин: N₂ оксидоредуктаза (АТФ-гидролизующая)
 - 1.18.99 С Н⁺ в качестве акцептора
 - 1.18.99.1 Гидрогеназа, ферредоксин:Н⁺ оксидоредуктаза
- 1.19 Действующие на восстановленный флаводоксин в качестве донора
 - 1.19.6 С N₂ в качестве акцептора
 - 1.19.6.1 Нитрогеназа (флаводоксин), восстановленный флаводоксин: ^ оксидоредуктаза (АТФ-гидролизующая)
- 1.97 Другие оксидоредуктазы
 - 1.97.1.3 Сероредуктаза, донор:сера оксидоредуктаза

2 Трансферазы

- 2.1 Переносящие одноуглеродные группы
 - 2.1.1 Метилтрансферазы
 - 2.1.1.23 Протеин-аргинин—N-метилтрансфераза, 8-аденозил-Ь-метионин:протеин-Ь-аргинин N-метилтрансфераза
 - 2.1.1.29 тРНК (цитозин-5-)-метилтрансфераза, S-аденозил- L-метионин:тРН К (цитозин-5-)-метилтрансфераза
 - 2.1.2 Трансферазы гидроксиметильных, формильных и родственных групп
 - 2.1.2.1 Серин-гидроксиметилтрансфераза, 5,10-метилентетрагидрофолат:глицин гидроксиметилтрансфераза
 - 2.1.3 Карбоксил- и карбамоилтрансферазы
 - 2.1.3.2 Аспартат-карбамоилтрансфераза, карбамоил фосфат: L-аспартат карбамоилтрансфераза
 - 2.1.4 Амидинотрансферазы
 - 2.1.4.1 Глицин-амидинотрансфераза, L-аргинин: глицин амидинотрансфераза
- 2.2 Переносящие альдегидные и кетонные группы
 - 2.2.1.1 Транскетолаза, седогептулозо-7-фосфат: D-глицеральдегид-3-фосфат гликольальдегидтрансфераза
 - 2.2.1.2 Трансальдолаза, седогептулозо-7-фосфат: D-глицеральдегид-3-фосфат глицерин-трансфераза
- 2.3 Ацилтрансферазы
 - 2.3.1 Ацилтрансферазы
 - 2.3.1.8 Фосфат-ацетилтрансфераза (фосфотрансацетилаза), ацетил- КоА:ортофосфат ацетилтрансфераза
 - 2.3.1.12 Дигидролипоамид ^-ацетилтрансфераза, ацетил-КоА:дигидролипоамид .^-ацетил-трансфераза
 - 2.3.1.61 Дигидролипоамид 5-сукцинилтрансфераза, сукцинил-КоА:дигидролипоамид .^-сукцинилтрансфераза
 - 2.3.1.85 Синтаза жирных кислот, ацил-КоА: малонил-КоА C-ацилтрансфераза (декарбокксилирующая, восстанавливающая оксоацильные и енольные группы, гидролизующая тиоэферы)

- 2.3.1.86 Синтаза жирных кислот дрожжей, ацил-КоА:малонил-КоА С-ацилтрансфераза (декарбоксилирующая, восстанавливающая оксоацильные и енольные группы)
- 2.3.2 Аминоацилтрансферазы
 - 2.3.2.6 Лейцилтрансфераза, L-лейцил-тРНК: протеин лейцилтрансфераза
- 2.4 Гликозилтрансферазы
 - 2.4.1 Гексозилтрансферазы
 - 2.4.1.1 Фосфорилаза, 1,4-а-0-глюкан:ортофосфат а-D-глюкозилтрансфераза
 - 2.4.1.11 Гликоген(крахмал)-синтаза, УДФ-глюкоза:гликоген 4-а-0-глюкозилтрансфераза
 - 2.4.1.18 1,4-а-Глюкан-ветвящий фермент, 1,4-а-0-глюкан:1,4-а-В-глюкан 6-а-D-(1,4-а-0-глюкано)-трансфераза
 - 2.4.2 Пентозилтрансферазы
 - 2.4.2.1 Фосфорилаза пуриновых нуклеозидов, пурииннуклеозидуртофосфат а-D-рибозилтрансфераза
 - 2.4.2.2 Фосфорилаза пиримидиновых нуклеозидов, пиримидиннуклеозидуртофосфат а-D-рибозилтрансфераза
 - 2.4.99 Переносящие другие гликозильные группы
- 2.5 Переносящие алкильные или арильные группы, кроме металлической
 - 2.5.1.6 Метионин-аденозилтрансфераза, АТФ: L-метионин 5-аденозилтрансфераза
- 2.6 Переносящие азотсодержащие группы
 - 2.6.1 Трансаминазы
 - 2.6.1.2 Аланинтрансаминаза, Б-аланин:2-оксоглутарат аминотрансфераза
 - 2.6.3 Оксиминотрансферазы
 - 2.6.99 Переносящие другие азотсодержащие группы
- 2.7 Переносящие фосфорсодержащие группы
 - 2.7.1 Фосфотрансферазы со спиртовой группой в качестве акцептора
 - 2.7.1.1 Гексокиназа, АТФ:0-гексоза 6-фосфотрансфераза
 - 2.7.1.2 Глюкокиназа, АТФ:Б-глюкоза 6-фосфотрансфераза

- 2.7.1.11 6-Фосфофруктокиназа, АТФ:0-фруктозо-6-фосфат 1-фосфотрансфераза
- 2.7.1.37 Протеинкиназа, АТФ:протеин фосфотрансфераза
- 2.7.1.38 Киназа фосфорилазы, АТФ:0-фосфорилаза-б фосфотрансфераза
- 2.7.1.40 Пируваткиназа, АТФ:пируват 2-О-фосфотрансфераза
- 2.7.2 Фосфотрансферазы с карбоксильными группами в качестве акцептора
 - 2.7.2.1 Ацетаткиназа, АТФ:ацетат фосфотрансфераза
- 2.7.3 Фосфотрансферазы с азотсодержащими группами в качестве акцептора
 - 2.13.2 Креатинкиназа, АТФ:креатин N-фосфотрансфераза
- 2.7.4 Фосфотрансферазы с фосфатными группами в качестве акцептора
 - 2.7.4.3 Аденилаткиназа, миокиназа, АТФ: АМФ фосфотрансфераза
 - 2.7.4.6 Нуклеозидцифосфаткиназа, АТФ:нуклеозидцифосфат фосфотрансфераза
- 2.7.6 Дифосфотрансферазы
 - 2.7.6.1 Рибозофосфат-пирофосфокиназа, АТФ: О-рибозо-5-фосфат пирофосфотрансфераза
- 2.7.7 Нуклеотидилтрансферазы
 - 2.1.1.2 ФМН-аденилилтрансфераза, АТФ: ФМН аденилилтрансфераза
 - 2.7.7.48 РНК-зависимая РНК-полимераза, нуклеозидтрифосфат:РНК нуклеотидилтрансфераза (РНК-зависимая)
 - 2.7.7.49 РНК-зависимая ДНК-полимераза, дезокси-нуклеозидтрифосфат:ДНК дезокси-нуклеотидилтрансфераза (РНК-зависимая)
- 2.7.8 Трансферазы других замещенных фосфатных групп
- 2.7.9 Фосфотрансферазы с парными акцепторами
- 2.8 Переносящие серосодержащие группы
 - 2.8.1 Серотрансферазы
 - 2.8.2 Сульфотрансферазы
 - 2.8.3 КоА-трансферазы
 - 2.8.3.3 Малонат-КоА-трансфераза, ацетил-КоА: малонат КоА-трансфераза

- 3 Гидролазы
- 3.1 Действующие на сложноэфирную связь (эстеразы)
 - 3.1.1 Гидролазы эфиров карбоновых кислот
 - 3.1.1.3 Триацилглицерол-липаза (липаза), триацилглицерол-ацилгидролаза
 - 3.1.1.4 Фосфолипаза A₂, фосфатидилхолин—2-ацилгидролаза
 - 3.1.1.7 Ацетилхолинэстераза, ацетилхолин-ацетилгидролаза
 - 3.1.1.8 Холинэстераза, ацилхолин-ацилгидролаза
 - 3.1.2 Гидролизующие тиолсложноэфирную связь
 - 3.1.2.2 Пальмитоил-КоА—гидролаза
 - 3.1.3 Гидролазы моноэфиров фосфорной кислоты (фосфатазы)
 - 3.1.3.1 Щелочная фосфатаза, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (с щелочным оптимумом действия)
 - 3.1.3.2 Кислая фосфатаза, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (с кислым оптимумом действия)
 - 3.1.4 Гидролазы диэфиров фосфорной кислоты (фосфодиэстеразы)
 - 3.1.4.1 Фосфодиэстераза I, олигонуклеинат—5'-нуклеотидгидролаза
 - 3.1.4.3 Фосфолипаза C, фосфатидилхолин холин-фосфогидролаза
 - 3.1.5 Гидролазы моноэфиров трифосфорной кислоты
 - 3.1.6 Гидролазы эфиров серной кислоты
 - 3.1.6.1 Арилсульфатаза, арилсульфат-сульфогидролаза
 - 3.1.7 Гидролазы моноэфиров дифосфорной кислоты
 - 3.1.8 Гидролазы триэфиров фосфорной кислоты
 - 3.1.11 Экзодезоксирибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфиры
 - 3.1.11.1 Экзодезоксирибонуклеаза I
 - 3.1.13 Экзорибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфиры
 - 3.1.13.1 Экзорибонуклеаза 11
 - 3.1.14 Экзорибонуклеазы, образующие не 5'-фосфомоноэфиры
 - 3.1.15 Экзонуклеазы, действующие либо на рибонуклеиновые, либо на дезоксирибонуклеиновые кислоты и образующие 5'-фосфомоноэфиры

- 3.1.16 Экзонуклеазы, действующие либо на рибонуклеиновые, либо на дезоксирибонуклеиновые кислоты и образующие не 5'-фосфомоноэфир
 - 3.1.21 Эндодезоксирибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфир
 - 3.1.21.1 Дезоксирибонуклеаза I
 - 3.1.22 Эндодезоксирибонуклеазы, образующие иные, не 5'-фосфомоноэфир
 - 3.1.22.1 Дезоксирибонуклеаза II
 - 3.1.25 Сайт-специфические эндодезоксирибонуклеазы, действующие на измененные основания
 - 3.1.26 Эндорибонуклеазы, образующие 5'-фосфомоноэфир
 - 3.1.27 Эндорибонуклеазы, образующие иные, не 5'-фосфомоноэфир
 - 3.1.30 Эндонуклеазы, действующие либо на рибонуклеиновые, либо на дезоксирибонуклеиновые кислоты и образующие 5'-фосфомоноэфир
 - 3.1.31 Эндонуклеазы, действующие либо на рибонуклеиновые, либо на дезоксирибонуклеиновые кислоты и образующие иные, не 5'-фосфомоноэфир
- 3.2 Гликозидазы
- 3.2.1 Гидролизующие соединения с O-гликозидной связью
 - 3.2.1.1 α -Амилаза, 1,4- α -О-глюкан глюканогидролаза
 - 3.2.1.2 (3-Амилаза, 1,4- β -О-глюкан мальтогидролаза
 - 3.2.1.4 Целлюлаза, 1,4-(1,3;1,4)- β -глюкан 4-глюканогидролаза
 - 3.2.1.17 Лизоцим, мукопептид—N-ацетилмурамилгидролаза
 - 3.2.1.20 α -Глюкозидаза, α -D-глюкозид-глюкогидролаза
 - 3.2.1.23 β -Галактозидаза, β -D-галактозид—галактогидролаза
 - 3.2.1.26 β -D-Фруктофуранозид—фруктогидролаза, β -фруктофуранозидаза, инвертаза, инвертин, сахараза, суфраза
 - 3.2.1.108 Лактаза, лактоза-галактогидролаза
 - 3.2.2 Гидролизующие соединения с N-гликозидной связью
 - 3.2.2.1 Пуриинуклеозидаза, N-рибозилпуриногидролаза

- 3.2.3 Гидролизующие соединения с S-гликозидной связью
 - 3.2.3.1 Тиоглужозидаза, тиоглюкозид-гликогидролаза
- 3.3 Действующие на простую эфирную связь
 - 3.3.1 Гидролазы тиоэфиров
 - 3.3.2 Гидролазы простых эфиров
 - 3.3.2.3 Эпоксидгидролаза
- 3.4 Действующие на пептидные связи (пептидазы)
 - 3.4.11 Аминопептидазы
 - 3.4.11.1 Лейциламинопептидаза
 - 3.4.13 Дипептидазы
 - 3.4.13.6 Cys-Gly-дипептидаза
 - 3.4.14 Дипептидилпеггидазы и трипептидилпептидазы
 - 3.4.15 Пептидилдипептидазы
 - 3.4.16 Сериновые карбоксипептидазы
 - 3.4.16.1 Сериновая карбоксипептидаза
 - 3.4.17 Металлокарбоксипептидазы
 - 3.4.17.1 Карбоксипептидаза А
 - 3.4.18 Цистеиновые карбоксипептидазы
 - 3.4.18.1 Цистеиновая карбоксипептидаза
 - 3.4.19 Омега-пептидазы
 - 3.4.19.1 Ациламиноацилпептидаза
 - 3.4.21 Сериновые эндопептидазы
 - 3.4.21.1 Химотрипсин
 - 3.4.21.4 Трипсин
 - 3.4.21.5 Тромбин
 - 3.4.21.62 Субтилизин
 - 3.4.22 Цистеиновые эндопептидазы
 - 3.4.22.1 Катепсин В
 - 3.4.22.2 Папаин
 - 3.4.22.17 Кальпаин
 - 3.4.23 Аспарагиновые эндопептидазы
 - 3.4.23.1 Пепсин А
 - 3.4.23.15 Ренин
 - 3.4.24 Металлоэндопептидазы
 - 3.4.24.3 Клостридиопептидаза А (коллагеназа)
 - 3.4.24.27 Термолизин
 - 3.4.99 Эндопептидазы с неизвестным механизмом каталитического действия
 - 3.4.99.46 Полиферментный эндопептидазный комплекс (протеасома)
- 3.5 Действующие на другую (не пептидную) связь углерод-азот
 - 3.5.1 В линейных амидах
 - 3.5.1.1 Аспарагиназа, L-аспарагин—амидогидролаза

- 3.5.1.4 Амидаза, ацилаза, ациламин—амидогидролаза
- 3.5.1.5 Уреаза, мочевино—амидогидролаза
- 3.5.1.35 D-Глутаминаза, D-глутамин—амидогидролаза
- 3.5.2 В циклических амидах
 - 3.5.2.3 Дигидрооротаза, карбамоиласпартикодегидраза, 5,6-дигидрооротат—амидогидролаза
- 3.5.3 В линейных амидах
 - 3.5.3.1 Аргиназа, L-аргинин—амидиногидролаза
- 3.5.4 В циклических амидах
 - 3.5.4.1 Цитозиндезаминаза, цитозин—аминогидролаза
- 3.5.5 В нитрилах
 - 3.5.5.1 Нитрилаза, нитрил—аминогидролаза
- 3.5.99 В других соединениях
 - 3.5.99.1 Рибофлавиназа, рибофлавин—гидролаза
- 3.6 Действующие на ангидриды кислот
 - 3.6.1 В фосфорсодержащих ангидридах
 - 3.6.1.5 Апираза, АТФ-дифосфогидролаза
 - 3.6.2 В серосодержащих ангидридах
 - 3.6.2.1 Аденилсульфатаза, аденилсульфатсульфогидролаза
- 3.7 Действующие на связь углерод-углерод
 - 3.7.1 В кетонах
 - 3.7.1.1 Оксалоацетаза, оксалоацетат—ацетилгидролаза
- 3.8 Действующие на связи галогенов
 - 3.8.1 В соединениях со связью С-галоген
 - 3.8.1.1 Алкилгалоидаза, алкилгалогенид-галогенидгидролаза
- 3.9 Действующие на связь азот-фосфор
 - 3.9.1.1 Фосфоамидаза, фосфамид—гидролаза
- 3.10 Действующие на связь азот-сера
 - 3.10.1.2 Цикламатсульфогидролаза, циклогексилсульфамат-сульфогидролаза
- 3.11 Действующие на связь углерод-фосфор
 - 3.11.1 Фосфоацетальдегид-гидролаза, фосфонатаза, 2-оксоэтилфосфонат-фосфогидролаза
- 3.12 Действующие на связь сера-сера
 - 3.12.1.1 Тритионатгидролаза, тритионат-тиосульфогидролаза

- Лиазы
- 4.1 Углерод-углерод лиазы
 - 4.1.1 Карбоксилиазы
 - 4.1.1.1 Пируватдекарбоксилаза, карбокси-лиаза 2-оксокислот
 - 4.1.1.17 Орнитиндекарбоксилаза, L-орнитин-карбокси-лиаза
 - 4.1.2 Альдегид-лиазы
 - 4.1.2.5 Треонин-альдолаза, L-треонин—ацетальдегид-лиаза
 - 4.1.2.9 Фосфокетолаза, Б-ксилоулозо-5-фосфат D-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза (ацетилирующая фосфат)
 - 4.1.3 Лиазы оксокислот
 - 4.1.3.1 Изоцитрат-лиаза, изоцитрат глиоксилат-лиаза
 - 4.1.3.2 Малатсинтаза, L-малат—глиоксилат-лиаза
 - 4.1.3.7 Цитратсинтаза (конденсирующий фермент), цитрат-оксалоацетат-лиаза
 - 4.1.3.27 Антранилатсинтаза, хоризмат—пируват-лиаза (аминоакцепторная)
 - 4.1.99 Другие углерод-углерод лиазы
 - 4.1.99.1 Триптофаназа, L-триптофан—индол-лиаза
- 4.2 Углерод-кислород лиазы
 - 4.2.1 Гидро-лиазы
 - 4.2.1.1 Карбонатдегидратаза, карбоангидраза, карбонат—гидро-лиаза
 - 4.2.1.2 Фумаратгидратаза, фумараза, L-малат-гидро-лиаза
 - 4.2.1.3 Аконитатгидратаза, аконитаза, цитрат(изоцитрат)—гидро-лиаза
 - 4.2.1.20 Триптофансинтаза, L-серин—гидро-лиаза (присоединяющая индол из индолглицерофосфата)
 - 4.2.2 Действующие на полисахариды
 - 4.2.2.1 Гиалуронидаза, гиалуронат-лиаза
 - 4.2.99 Другие углерод-кислород лиазы
 - 4.2.99.2 Треонинсинтаза, O-фосфо-L-гомосерин фосфо-лиаза (присоединяющая воду)
- 4.3 Углерод-азот лиазы
 - 4.3.1 Аммиак-лиазы
 - 4.3.1.1 Аспартаза, L-аспартат аммиак-лиаза

- 4.3.2 Амидин-лиазы
 - 4.3.2.1 Аргининосукцинат-лиаза, аргининосукциназа, L-аргининосукцинат аргинин-лиаза
- 4.3.3 Амидо-лиазы
- 4.3.99 Другие углерод-азот лиазы
 - 4.3.99.1 Цианат-лиаза, цианат C-N-лиаза
- 4.4 Углерод-сера лиазы
 - 4.4.1.2 Гомоцистеиндесульфгидраза, L-гомоцистеин сероводород-лиаза (дезаминирующая)
- 4.5 Углерод-галоген лиазы
 - 4.5.1.1 ДДТ-дегидрохлориназа, 1,1,1-трихлор-2,2-бис(4-хлорфенил)этан гидрохлорид-лиаза
- 4.6 Фосфор-кислород лиазы
 - 4.6.1.1 Аденилатциклаза, АТФ-пирофосфат-лиаза (циклизующая)
- 4.99 Другие лиазы
 - 4.99.1.1 Феррохелатаза, протогем—ферро-лиаза
- 5 Изомеразы
- 5.1 Рацемазы и эпимеразы
 - 5.1.1.1 Аланинрацемаза
 - 5.1.2 Действующие на гидроксикислоты и их производные
 - 5.1.2.1 Лактатрацемаза
 - 5.1.3 Действующие на углеводы и их производные
 - 5.1.3.1 Рибулозофосфат-3-эпимераза, D-рибулозо-5-фосфат 3-эпимераза
 - 5.1.99 Действующие на другие соединения
 - 5.1.99.1 Метилмалонил-КоА-рацемаза, 2-метил-3-оксопропаноил-КоА—2-эпимераза
- 5.2 *Цис-транс-изомеразы*
 - 5.2.1.3 Ретиналь-изомераза, полностью-*транс*-ретиналь 1 \-*цис-транс-июмераза*
- 5.3 Внутримолекулярные оксидоредуктазы
 - 5.3.1 Осуществляющие взаимопревращения альдоз и кетоз
 - 5.3.1.1 Триозофосфатизомераза, D-глицеральдегид-3-фосфат кетолизомераза
 - 5.3.1.5 Ксилозоизомераза, D-ксилоза кетол-изомераза
 - 5.3.2 Осуществляющие кетоенольные превращения
 - 5.3.2.1 Фенилпируват-таутомераза, фенилпируват кетоенол-изомераза

- 5.3.3 Переносящие C=C связи
 - 5.3.3.1 Стероид-D-изомераза, 3-оксостероид D⁵-D⁴-изомераза
- 5.3.4 Переносящие S-S связи
 - 5.3.4.1 Белок—дисульфид-изомераза
- 5.3.99 Другие внутримолекулярные оксидоредуктазы
 - 5.3.99.7 Стиреноксидизомераза (расщепляющая эпоксиды)
- 5.4 Внутримолекулярные трансферазы (мутазы)
 - 5.4.1 Переносящие ацильные группы
 - 5.4.1.1 Лизолецитинацилмутаза, лизолецитин—2,3-ацилмутаза
 - 5.4.2 Фосфотрансферазы (фосфомутазы)
 - 5.4.2.2 Фосфоглюкомутаза, α-D-глюкоза 1,6-фосфомутаза
 - 5.4.3 Переносящие аминогруппы
 - 5.4.3.2 Лизин—2,3-аминомутаза, L-лизин 2,3-аминомутаза
 - 5.4.99 Переносящие другие группы
 - 5.4.99.5 Хоризматмутаза, хоризмат—пируватмутаза
- 5.5 Внутримолекулярные лиазы
 - 5.5.1.1 Муконат-циклоизомераза, 2,5-дигидро-5-оксофуран-2-ацетат-лиаза (дециклизующая)
- 5.99 Другие изомеразы
 - 5.99.1.2 ДНК-топоизомераза
- 6 **Лигазы**
 - 6.1 Образующие связь углерод-кислород
 - 6.1.1 Лигазы, образующие аминоксил-тРНК и родственные соединения
 - 6.1.1.1 Тирозил-тРНК—лигаза, β-тирозин:тРНК синтетаза
 - 6.2 Образующие связь углерод-сера
 - 6.2.1 Кислота-тиол лигазы
 - 6.2.1.1 Ацетил-КоА—лигаза, ацетат:КоА лигаза (АМФ образующая)
 - 6.3 Образующие связь углерод-азот
 - 6.3.1 Кислота-аммиак (или амин) лигазы (амидсинтетазы)
 - 6.3.1.2 Глутамат-аммиак-лигаза, глутаминсинтетаза, β-глутамат:аммиак лигаза (АДФ образующая)
 - 6.3.2 Кислота-аминокислота лигазы (пептисинтетазы)

- 6.3.2.3 Глутатионсинтетаза, у- γ -глутамил- γ -цистеинхлицин лигаза (АДФ-образующая)
- 6.3.3 Циклолигазы
- 6.3.4 Другие углерод-азот лигазы
 - 6.3.4.1 ГМФ-синтетаза, ксантозин-5'-фосфат: аммиак лигаза (АМФ образующая)
- 6.3.5 Углерод-азот лигазы с глутамином в качестве донора амидного азота
 - 6.3.5.2 ГМФ-синтетаза (глутамин гидролизующая)
- 6.4 Образующие связь углерод-углерод
 - 6.4.1.1 Пируваткарбоксилаза, пируват:CO₂ лигаза (АДФ образующая)
 - 6.4.1.2 Ацетил-КоА-карбоксилаза, ацетил-КоА: CO₂ лигаза (АДФ образующая)
- 6.5 Образующие фосфоэфирную связь
 - 6.5.1.1 ДНК-лигаза (АТФ), поли(дезоксирибонуклеотид):поли(дезоксирибонуклеотид) лигаза (АМФ образующая)

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- ELISA, *см.* Твердофазный иммуноферментный анализ
рН-метр 82, 206
рН-стат 84
рН-электрод 206
- А**
АБТС, *см.* Азино-бис-этилбензотиазолин сульфоновая кислота
Автоматический титратор 84, 140
Агароза, активированная бромцианом 206
АДГ, *см.* Алкогольдегидрогеназа
Аденозинтрифосфатаза 166
Адсорбция 259
АДФ 166
Азино-бис-этилбензотиазолинсульфоновая кислота (АБТС) 117
Азоказеин 158
Аланиндегидрогеназа 293
Алканаль-монооксигеназа 80
Алкогольдегидрогеназа 101, 167
 восстановительная реакция 101
 окислительная реакция 102
 регенерация косубстрата 290
 ферментный сенсор 298
Алкоголь-оксидаза 298
Альгинат 260
Альдолаза 168
Алюминия оксид 264
а-Амилаза 147
Амилоглюкозидаза 149
Аминогексил-Сефароза 202, 206 и сл.
Аммония сульфат, для осаждения 196
Амперометрические ферментные сенсоры 295 и сл.
Анилинафталин-сульфонат (АНС) 250 и сл.
Ансона метод 154
Антитела
 введение тиогрупп 209
 конъюгация 210, 211
 иммобилизация 206 и сл.
 иммуноферментный анализ 203 и сл.
 иммуноэлектроды 300
Антраилатсинтаза 169
- Аргиназа 17
Аскорбатоксидаза 299
Аспарагиназа 163, 302
Аспаратаминотрансфераза 58
АТФ 166
Е-АТФ 247
АТФ-аза, *см.* Аденозинтрифосфатаза
АХЭ, *см.* Ацетилхолинэстераза
Ацетальдегид 101
Ацетаткиназа 137, 290
Ацетатный буфер 96
Ацетилхолин 143
Ацетилхолинэстераза 142, 143, 296, 300
- Б**
Белок
 иммобилизация 206 и сл., 286
 концентрирование 195 и сл.
 определение 179 и сл., 286
 УФ-спектр 184, 236
 флуоресценция 247
Бензоиларгинин *n*-нитроанилид 163
Бесконкурентное ингибирование 33
Биоаффинные сенсоры 302
Биолюминесценция 80
Биореактор 290
Биосенсор 294
Биуретовая реакция 179
Бицинхониновая кислота, метод определения белка 180
Броди раствор 85
Брэдфорд метод 183
БСА, *см.* Бычий сывороточный альбумин
Бугера-Ламберта-Бера закон 74
Бутирилхолинэстераза 142
Буфер 43, 92 и сл.
 биологический 93
 Гуда 93
 летучий 97
 приготовление 93
Бычий сывороточный альбумин (БСА) 223, 250
- В**
Вант-Гоффа уравнение 239

- Варбурга* манометр 85
Внутреннего фильтра эффект 78
Возбуждения спектр 76, 247
- Г**
Г6ФДГ, см. Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа
Р-Галактозидаза
анализ 152
конъюгация с антителами 210
Гваякол 117
Гексокиназа 135
Гель-фильтрация 230
Гемицеллюлоза 172
Гемоглобин 154
Гидразина сульфат 168
Гидроксипатит 259
Гидроксилокапронатдегидрогеназа 17
2-Гидрокси-1-нафталдегид 193
Гидролазы 139 и сл.
Гиперболическая кривая с насыщением 29
Гистерезисные ферменты 35
Гликоген 149
Глицеральдегид-3-фосфат 110
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
61, ПО, 138
восстановительная реакция 111
окислительная реакция 110
Глицеро-3-фосфат 111
Глутаматдегидрогеназа 112
Глутарил-фенилаланин-4-нитроанилид 161
Глутаровый альдегид 211, 262, 266, 276 и сл.
Глутатионпероксидаза 17
Глюкоамилаза 149
Глюкоза, определение 151
а-Глюкозидаза 150
р-Глюкозидаза 302
Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа 55, 62, 64, 107 и сл., 134, 135, 149, 150, 175
Глюкозоизомераза 17, 40, 171, 174
Глюкозооксидаза 109, 296 и сл.
Гуммиарабик, эмульсия 140
- Д**
Двойные обратные координаты 30 и сл.
Двухлучевой фотометр 68
Двухфазная система 293
ДЕАЕ, см. Диэтиламиноэтил
Дегидрогеназы 99 и сл.
Дедерон (Dedegon) 275
Денатурация 44
Диазотизация 271, 273
Диализ 199, 221
мембраны 225
Диаминогексан 207, 265 и сл.
Дианизидин 118
Диафораза 14, 42, 128 и сл.
Дигидролипоамид 128 и сл.
Дигидрол и п оамидацетилтрансфераза 125
метод остановки реакции 126
спектральный анализ 125
Дигидролипоамид-дегидрогеназа 128
восстановление липоамида 129
окисление дигидролипоамида 128
Диметилам и нобензальдегид 224, 225
Диметилсуберимидат 212, 262, 266
Диолен (Diolen) 282
Дисперсия оптического вращения (ДОВ) 82
спектрометр 82, 153
Диссоциации константа 26, 92
Дитиотрейтол (ДТТ) 45
Дитиоэритрит (ДТЭ) 45, 102, 121, 123, 129
Дифференциальная спектроскопия 235
Дихлорфенолиндофенол 125
Диэтиламиноэтил 259
- З**
Закон Бугера-Ламберта-Вега 14
Закон действующих масс 26
- И**
Иди-Хофсти координаты 30
Изомеразы 171 и сл.
Изоцитратдегидрогеназа 106
Иммобилизация, методы 206 и сл., 258 и сл.
Иммобилизованные клетки 294
Иммобилизованные ферменты
анализ 286 и сл.
в терапии 302
в ферментных сенсорах 294 и сл.
определение белка 286
Иммуносенсор 300
Иммуноэлектрод 300
Инактивация 46 и сл.

- Инвертаза 81, 153 и сл., 257
 Инвертин 153
 Ингибирование 32 и сл.
 Индикаторная реакция 56
 Индикаторный электрод 82
 Индол 223 и сл.
 Индофенилацетат 143
 Интерференционная спектроскопия 256
 Ионная сила 43
 Ионообменная хроматография
 иммобилизация ферментов 259
 концентрирование белка 202
 Ионоселективный электрод 295 и сл.
 Испускания спектр 75 и сл., 247 и сл.
- К**
 Казеин 157 и сл.
 Кальпаина ингибитор 46
 е-Капролактагм 275
 Карбоангидраза 17, 170
 Карбоксиметил 259
 Карбонилдимидазол 285
 Касательных метод 37
 Катал 50, 52
 Каталаза
 анализ 115
 в терапии 302
 дифференциальная спектроскопия 239
 Каталитическая константа 54
 Каталитическая эффективность 54
 Квантовый выход 79
 Керамика 264
 Кинетическая кривая 33 и сл.
 Кинетические константы 29 и сл.
 Кинетические методы определения
 субстрата 62
 Кислородный электрод 86
Кларка электрод 86, 294
Клеланда реагент 45
 Ковалентная иммобилизация ферментов 264, 269
 Колориметрические методы 66 и сл.
 Комплекс 20
 Конечная точка, метод анализа 59 и сл.
 Конкурентное ингибирование 32 и сл.
 Константа скорости 25 и сл.
 Концентрационное тушение 78
 Концентрирование белка осаждением 195
 Кофакторы для иммобилизованных ферментов 285
- Крахмал 147
 Креатининминогидролаза 299
 Креатинкиназа 79
 Кристаллизация 202
 Ксиланаза 171
 Ксилоизомеразы 17, 171 и сл.
 Ксилулокиназа 171
 Кумасси синий, для определения белка 183
 КФ (классификация ферментов) 20, 304
 Кюветы
 для флуоресцентного анализа 250
 комбинированные 238
- Л**
 Лаг-фаза 35
Лайнуивера-Берка координаты 30 и сл.
 Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) 104, 122, 136, 137, 177
 восстановление 104
 окисление 103
 спектроскопическое определение 104
 ферментный сенсор 299
 флуоресцентный анализ 105
 Лактатоксидаза 299
 ЛАП, см. Лейцинаминопептидаза
 ЛДГ, см. Лактатдегидрогеназа
 Лейпептин 45
 Лейцинаминопептидаза 160
 Лиазы 167 и сл.
 Лиганд 213 и сл.
 Лизоцим 78, 150
 Линеаризация
 уравнения *Михаэлиса-Ментен* 28 и сл.
 уравнения связывания 229
 Линейная регрессия 70
 Лиофилизация 201
 Липаза 78, 139
 Липоамид 125, 128
 Липосомы 261
Лоури метод 182
 Люминометрия 79
 Люцифераза 79, 119 и сл.
 Люциферин 119
- М**
 α_2 -Макроглобулин 46
 Максимальная скорость 27 и сл.
 Малатдегидрогеназа (МДГ) 58, 64, 108 и сл.

- Малеимидобензоил-Г4-гидроксисукцинимид 210
Мальтаза 150
Мальтоза 147, 150
Матрица (носитель) 257 и сл.
МДГ, см. Малатдегидрогеназа
Международные единицы ферментативной активности (МЕ) 49
Мелдола синь 206
Мембранный реактор 292
Металлопротеиназы 46
Микрокапсулирование 261, 267, 303
Михаэлиса константа 27
Михаэлиса-Ментен уравнение 25 и сл.
интегрирование 31
линеаризация 30
определение концентрации субстрата 62
- Н
НАД⁺ 98, 99
определение концентрации 177
НАДН 98
определение концентрации 177
УФ-спектр 72
флуоресценция 75
НАДФ' 99
определение концентрации 175
Насыщение, график 29, 31
2-Нафтол-1-карбоксихальдегид 193
Начальная скорость 34 и сл.
Нейлон 267, 274
Неконкурентное ингибирование 32 и сл.
Необратимое связывание 213
Неспецифическое связывание 213
Несслера реагент 163
Нефелометрия 74
Николя призма 81
Никотинамид динуклеотиды, определение концентрации 175 и сл.
Нингидриновый метод 158, 190, 191
модификация для иммобилизованных ферментов 191
определение концентрации белка 158, 190
— активности протеаз 158
Нитрогеназа 17
Нитрофенилгалактопиранозид 152
Нитрофенилфосфат 145
Номенклатура ферментов 19
Носители 257 и сл.
- О
Обратимое связывание 213
Объемная активность 52, 97
Одноручевой фотометр 67 и сл.
Окислительно-восстановительные реакции 84
Оксалатдекарбоксилаза 299
Оксалатоксидаза 299
Оксидаза L-аминокислот 113
Оксидоредуктазы определение 99 и сл.
а-Оксоглутаратдегидрогеназа 132
а-Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс 130 и сл.
Оптическая активность 81
Оптические биосенсоры 301
Оптические методы анализа 99 и сл.
иммобилизованных ферментов 287
Орогидин-5'-фосфат—декарбоксилаза 16
Остановка реакции, метод анализа 41, 53
Относительные световые единицы 80
Отражательная интерференционная спектроскопия 256
- П
Пепсин 42, 162
Пептидазы 154 и сл.
Перекрестные шивки 212, 258, 262
Переходного состояния аналоги 214
Периодат, активация носителя 208 и сл.
Перлон 275
Пероксидаза 109, 113, 116
определение активности 116
иммобилизация 209
Пируват:ферредоксин—оксидоредуктаза 112
Пируватдегидрогеназа (липоамвд) 45, 124, 125
Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГК) 51, 120 и сл.
анализ восстановления НАД⁺ 121
Пируватдекарбоксилаза 86, 167
Пируваткиназа 80, 136
Пируватсинтаза 112
Платиновый электрод 84, 300
Поглощение света
коэффициент 50, 66 и сл.
метод анализа 66 и сл.
определение концентрации белков 184

- спектр белков 184
 фотометр 66 и сл.
 Полевой транзистор 301
 Полиакриламид 260, 264
 включение белка 260, 267
 Полиамид 264, 274
 иммобилизация ферментов 274
 частичный гидролиз 278 и сл.
 Поливиниловый спирт 274
 Полистирол 264
 Полиэтилен 274
 Полиэтилентерефталат 282
 Полиэфир 264, 274, 291
 Полые волокна 261, 293
 Поляризационный фильтр 81
 Поляриметр 81, 153
 Поляриметрия 81
 Порфириновое кольцо 239
 Порядок реакции 20—23
 Потенциометрические ферментные сенсоры 295
 Потенциометрия 84
 Предстационная фаза 34
 Продуктивность 50
 Протеазы 46, 154 и сл.
 Протеолиз 46
 Протогематин IX 115, 116
- Р
 Равновесный диализ 221
 Радиоактивная метка 86
 Радиоиммуноанализ (РИА) 203
 Район (Rayon) 283
 Рамановский спектр 78, 248
 Реактор 290 и сл.
 периодического действия 292
 с неподвижным слоем 293
 с перемешиванием 292
 Релеевское рассеяние 78, 248
 РИА, см. Радиоиммуноанализ
 Рибонуклеаза 147
 РНК-аза I, см. Рибонуклеаза
- С
 Сахароза 153
 Сахароза 153
 Связывания анализ 219 и сл.
 оценка результатов 257
 спектральные методы 234
 Связывания уравнение 228
 линеаризация 229
 Семикарбазид 102
 Сериновые протеазы 46
 Сефадекс 230
 Сефароза 206 и сл.
 Силанизация 269
 Синтаза жирных кислот 132
Скэтчарда координаты 229, 230
 Сопряженные ферментативные реакции 55 и сл.
 две реакции 55
 для определения субстрата 59, 62
 — фермента 55
 три реакции 59
 Спейсер 207, 257, 265
 Спектроскопическое титрование 235 и сл.
 Спектроскопия 66 и сл.
 абсорбционная 184, 236
 дифференциальная 235 и сл.
 интерференционная 256
 флуоресцентная 247
 Спектрофотометр 66 и сл.
 двойной пучок 235
 чип-диод 235
 Старый желтый фермент 19
 Стационарности условия 25 и сл.
 Стекло
 для иммобилизации 269
 с контролируемым размером пор 272
 Стекланный электрод 82
 Степень очистки 54
Стокелла уравнение 246
 Субстрат, определение концентрации 59 и сл.
 кинетические методы 62
 метод конечной точки 59
 сопряженные ферментативные реакции 62
 циклические ферментативные процессы 63
 Субстратное ингибирование 28
 Суицидный субстрат 46, 214
 Сукцинилфенилаланин-л-нитроанилид 122
 Сульфгидрильные группы, защита 45
 Сывороточный альбумин 226
- Т
 Тангенсов (касательных) метод 37
 Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) 203
 неконкурентный 204
 конкурентный 205

- Твердый носитель 264
Температурный оптимум 43
Теорелла-Стенхагена буфер 96
Терифталат 282
Терилен (Tegulen) 282
Термистор 301
Тестовая реакция 56
Тетрафторборат триэтилоксония 275
Тиаминдифосфат 214
Тиндаля эффект 78
Тиогруппы, введение в белки 209
Тиоловые реагенты 45
Тирозин 185, 186, 237, 247
Тирозиназа 17
Тозилхлорид 284
Трансферазы 132 и сл.
Триозофосфатизомераза 17
Трипсин 36, 163
Триптофан
 УФ-спектр 185, 186
 флуоресценция 247
Трис 43, 95
Трис-НС1 96
Триэтаноламин 96, 139
Турбидиметрия 74
Тушение флуоресценции 78, 247, 249
- У
- Удельная ферментативная активность 54, 97
Удельное вращение 81
Ультрафильтрация 199, 220
Ультрацентрифугирование 201, 232
 в градиенте сахарозы 233
Умбеллиферон 76
Универсальный буфер 96
Уреаза 164, 296
 анализ на pH-стате 165
 в терапии 303
 фотометрический анализ 171
Уриказа 114, 299
УФ/ввдимая фотометрия 66 и сл.
УФ-спектр белков 183 и сл.
- Ф
- ФАД 121 и сл.
Фенилаланин-аммиак-лиаза 302
Фенилметилсульфонилфторид 46
Фермент 304 и сл.
 денатурация 44
 из термофильных источников 45
 иммобилизация 206 и сл., 257 и сл.
 ингибирование 32, 33
 классификация 20
 комплексы 20
 номенклатура 19
Ферментативная активность 52 и сл., 97 и сл.
 единицы 52
 общая 53
 объемная 52, 97
 расчет 52, 97
 сохранение 88
 удельная 54, 97
Ферментативный анализ 87 и сл.
 pH 42
 влияющие факторы 45 и сл.
 выбор буфера 43, 93 и сл.
 для иммобилизованных ферментов 286 и сл.
 ионная сила 43
 концентрация компонентов 47
 температура 43
Ферментный полевой транзистор 301
Ферментный реактор 290 и сл.
Ферментный электрод 294
Феррицианид 299
Фильтровый фотометр 67
Флуорескамин 188
Флуоресцеин 76, 141
Флуоресцеиндибутират 141
Флуоресцентный анализ 100, 105, 169
 определение концентрации белка 187
Флуоресценция 75 и сл.
 анализ 75 и сл., 105, 169
 тушение 78, 247, 249
 спектр 247 и сл.
Флуориметр 77
Флуорофор 75, 77, 248
ФМН-редуктаза 80
Фолина-Чокалтеу реагент 155, 183
Формазин 75
Формиатдегидрогеназа 290, 293
Фосфата определение 194
Фосфатаза
 кислая 146
 щелочная 42, 144, 211
Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) 96
3-Фосфоглицераткиназа 111, 138
Фосфоглюкомутаза 133
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа 175
Фосфорилаза а 133
Фосфотрансацетилаза 122, 125
Фосфотрансфераза 64

Фотометр 66 и сл., 234 и сл.
Р-Фруктозидаза 153
Фумараза 171

Х

Хайнса уравнение 30
Хаотропные вещества 196, 202, 300
Хендерсона-Хассельбаха уравнение 92
Химотрипсин 121, 161
Холестеролоксидаза 299
Холиноксидаза 300
Холинэстераза 142 и сл.
Хоризмат 169
Хорионический гонадотропин 300
Хранение ферментов и растворов 89

Ц

Целлюлаза 74
Целлюлоза, активация периодатом 208
Цистеиновые протеазы 46
Цитохром с 112
Цитохромоксидаза 17
Цитратсинтаза 58, 64

Ч

Число оборотов фермента 54

Ш

Шикиматдегидрогеназа 103

Щ

Щелочная фосфатаза 42, 144, 211
конъюгация с антителами 211
определение активности 144, 145

Э

ЭГТА46
ЭДТА 46
Экзопептидаза 154, 160
Экзо-фермент 172
Экстинкции коэффициент 50
Электрод 82
рН 82, 294
для определения CO_2 86
ионоселективный 294
кислородный 86, 294
Кларка 86
Электродвижущая сила 82
Электрохимический сенсор 294
Эндопептидаза 154
Энтальпия реакции 239
Эрлиха реагент 234
Этиленгликоль 282