

Р. А. Волков, І. І. Панчук

БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ РОСЛИН



Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

Р.А. Волков, І.І. Панчук

БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ РОСЛИН

Навчальний посібник



Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2023

УДК 577.2(075.8)
В 676

Друкується за ухвалою Вченої ради
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича
(протокол №15 від 27.12.23)

Рецензенти:

Лихолат Ю.В., доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара;

Столяр О.Б., доктор біологічних наук, професор кафедри хімії та методики її навчання Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка.

Волков Р.А.

В 676

Біохімічні методи дослідження рослин : навч. посібник.
Вид. 2-ге, переробл. та доповн. / Р.А. Волков, І.І. Панчук.
Чернівці : Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2023. –
152 с.

ISBN 978-966-423-830-1

У навчальному посібнику наведені теоретичні основи методів (спектрометрія, центрифугування, хроматографія, електрофорез), які використовуються у дослідженнях з біохімії рослин. Детально описано широкий спектр методик, що дозволяє отримати практичні навички роботи у лабораторії.

Для студентів, аспірантів, молодих науковців біологічних і медичних спеціальностей.

УДК 577.2(075.8)

© Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича, 2023

ISBN 978-966-423-830-1

© Волков Р.А., Панчук І.І., 2023

ПЕРЕДМОВА

Бурхливий розвиток біології протягом XX століття остаточно перетворив цю науку на експериментальну дисципліну. Подальший прогрес у розумінні фундаментальних біологічних явищ і розвиток на цій основі новітніх технологій значною мірою пов'язаний із розробкою нових експериментальних підходів. Отже, вміння вільно оперувати широким арсеналом лабораторних методів та розуміння їх теоретичних основ – обов'язкова умова підготовки сучасного фахівця-біолога. Розуміння цього зумовило формування у промислово розвинутих країнах концепції дослідницько-орієнтованого навчання в університетах. Потреби сучасної економіки висувають на порядок денний необхідність покращення лабораторної підготовки фахівців і в Україні. Тому, спираючись на власний дослідницький досвід, при написанні посібника автори намагалися зібрати методики, які ілюструють різні методи та підходи, які застосовуються у сучасній біохімії рослин і були б корисні студентам, аспірантам та молодим науковцям при виконанні власних досліджень.

Автори

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АКА-БІС – суміш акриламід у та бісакриламід у

АПС – амонію персульфат

АФК – активні форми кисню

ДДС-Na – додецилсульфат натрію

ДНФГ – динітрофеніл гідразин

ЕДТА – Na-ЕДТА, Na-етилендіамінтетраацетат

ПААГ – поліакриламідний гель

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТБКАП – тіобарбітурат-активні продукти

ТЕ – 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), 1 мМ ЕДТА (рН 8,0)

ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилетилендіамід

ТХО – трихлороцтова кислота

АРХ – аскорбатпероксидаза

Asc – аскорбат (відновлена форма вітаміну С)

САТ – каталаза

ДНА – дегідроаскорбат (окислена форма вітаміну С)

DHAR – дегідроаскорбат редуктаза

DTT – дитіотрейтол

GR – глутатіонредуктаза

GSH – глутатіон

LOX – ліпоксигеназа

POD – гваяколпероксидаза

SOD – супероксиддисмутаза

TAE – трис-ацетат-ЕДТА, буфер для електрофорезу

TBE – трис-борат-ЕДТА, буфер для електрофорезу

TEMED – тетраметилендіамін

SSA – сульфосаліцилова кислота

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розчини та їх приготування

Розчин – це однофазна, гомогенна система, яка складається з двох і більше компонентів, кількість яких один відносно одного може змінюватись у широких межах. Кожний розчин складається з розчинених речовин і розчинника, тобто середовища, у якому рівномірно розподілені молекули цих речовини. Звичайно розчинником вважається той компонент, який у чистому вигляді існує в такому ж агрегатному стані, як і отриманий розчин. Якщо обидва компоненти до розчинення перебували в однаковому агрегатному стані (наприклад, етанол і вода), то розчинником є той компонент, якого більше. Основний розчинник у розчинах, що використовуються в біологічних дослідженнях, – це вода. Проте, не всі речовини розчинні у воді, тому іноді як розчинники застосовуються інші речовини – етанол, ацетон, бензол, ксилол, диметилсульфоксид, формаїд та інші органічні розчинники.

Концентрація розчинів

При використанні розчинів важливо знати, скільки розчиненої речовини міститься в даній кількості розчину. Кількість розчиненої речовини, яка міститься в певній кількості розчину, називається концентрацією. Концентрацію розчинів можна виражати по-різному. Найчастіше застосовуються такі способи вираження концентрації.

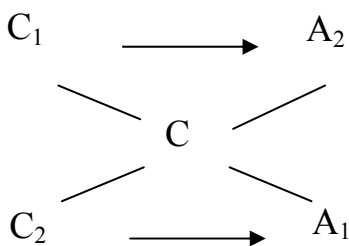
Процентна концентрація розчину показує, скільки грамів розчиненої речовини міститься в 100 г розчину. Наприклад, 10 %-й розчин хлориду натрію містить 10 г NaCl та 90 г води.

Мольно-об'ємна концентрація (молярність, M) – це кількість молів розчиненої речовини, що міститься в 1 л розчину. Наприклад, 5 М хлорид натрію означає, що в кожному літрі розчину міститься 5 молів NaCl, тобто 292,5 г NaCl.

Кількість еквівалентів розчиненої речовини, що міститься в одному літрі розчину, називається *еквівалентною концентрацією, або нормальністю (n)*. Так, 2 н H_2SO_4 – це розчин сірчаної кислоти, у кожному літрі якого міститься два еквіваленти, тобто 98 г H_2SO_4 .

Крім концентрації, важлива характеристика розчину – його питома вага, або густина. Це величина, яка показує, у скільки разів вага даної рідини більша або менша за вагу води такого ж об'єму. Густина розчину пропорційна його концентрації. Для визначення питомої ваги користуються ареометром. Густина необхідно враховувати при приготуванні розчинів заданої концентрації.

У лабораторії часто готуються та зберігаються маточні розчини, з яких потім готують більш розведені, необхідні для роботи розчини. Для останніх використовують «правило хреста», яке має такий вигляд:



де:

C – концентрація (у %), яку необхідно отримати;

C_1 – концентрація концентрованого розчину;

C_2 – концентрація розведеного розчину;

A_1 – маса розведеного розчину, яку необхідно взяти для розведення; значення A_1 вираховується як різниця $C_1 - C$;

A_2 – маса концентрованого розчину, що необхідна для розведення, значення A_2 вираховується як $C - C_2$.

Технологія приготування розчинів

Перший етап приготування розчинів у лабораторії – зважування необхідних речовин на вазі. Залежно від точності зважування ваги поділяють на дві групи:

- технічні (з точністю до 0,1 г);
- аналітичні (до 0,1 мг).

У лабораторіях використовують механічні (аптечні, технохімічні, аналітичні та демпферні), пружинні та електронні ваги з цифровою індикацією. Перед початком роботи ваги встановлюють стаціонарно на стабільну поверхню та горизонтують їх. Зазвичай, ваги мають рідинний рівень із бульбашкою повітря. За допомогою рідинного рівня вага горизонтується у такий спосіб, щоб бульбашка повітря знаходилась у середині позначеного кола. Зважування на неправильно встановлених вагах призводитиме до похибки.

Для приготування розчину необхідну кількість речовини за допомогою шпателя або лабораторної ложечки зважують у склянку або спеціально призначену ємність. При зважуванні необхідно враховувати вагу посуду, у якому зважують. При користуванні аналітичними або торсійними вагами їх необхідно вимикати при кожному додаванні речовини, після чого їх вмикають і перевіряють вагу. Відважену речовину обережно пересипають у склянку для приготування розчину, після чого додають воду або інший розчинник. Деякі речовини прилипають до сухого посуду, що перешкоджає їх ефективному розчиненню при додаванні розчинника. Для запобігання цьому необхідно насипати речовину в розчинник.

Особливої уваги вимагає приготування багатокомпонентних розчинів. Не варто змішувати між собою всі компоненти у сухому вигляді. Спершу необхідно змішати розчинник з одним із компонентів. Додавати наступні речовини можна тільки після повного розчинення попередньої.

При приготуванні розчинів потрібно пам'ятати таке:

- деякі речовини розчинні тільки при певних значеннях рН. Тому потрібно довести рН розчину до необхідної величини. Наприклад, ЕДТА не розчиниться у воді, поки рН не становитиме 8,0;

- приготування висококонцентрованих розчинів іноді вимагає нагрівання. Наприклад, NaCl легко розчиняється у воді при концентрації 1 М. Проте, в лабораторії часто готується висококонцентрований маточний розчин (stock solution) у концентрації 5 М. Приготування такого розчину потребує нагрівання. У деяких випадках розчинник з речовиною нагрівають для прискорення розчинення. Наприклад, під час розчинення сечовини у воді розчин охолоджується і для прискорення розчинення його можна нагріти. Утім пам'ятайте, що надмірне нагрівання призводить до розкладання сечовини. При нагріванні розчинів не варто використовувати відкрите полум'я, ліпше користуватися електроплиткою або електромагнітною мішалкою з підігрівом;

- деякі речовини (антибіотики та гормони), що використовуються у біологічній лабораторії, майже нерозчинні у воді. У таких випадках треба використовувати інші розчинники, наприклад, слабкі розчини кислот або лугів, етанол, диметилсульфоксид тощо. Так, антибіотик рифампіцин нерозчинний у воді, проте добре розчиняється у диметилсульфоксиді, фітогормон кінетин – в етанолі. Зазначимо, що такі речовини можуть бути нерозчинними у воді у великих концентраціях (для антибіотиків і гормонів готуються зазвичай маточні розчини 1000-кратної

концентрації). Втім такі речовини у малих концентраціях – 10^{-4} – 10^{-5} М – розчиняються у воді, а саме такі концентрації використовуються у поживних середовищах. Тому маточні розчини, приготовлені на етанолі або інших органічних розчинниках, можуть використовуватися для приготування водних розчинів.

Іноді може виникнути необхідність перевірити концентрацію приготовленого розчину. Це пов'язано з тим, що деякі сухі речовини надзвичайно гігроскопічні. Під час їх зберігання вони поглинають воду з повітря, що не дає зважити точну кількість сухої речовини. У таких випадках при приготуванні розчину його концентрацію необхідно додатково перевірити, наприклад, вимірюванням густини за допомогою ареометра або коефіцієнта заломлення за допомогою рефрактометра.

Зберігання розчинів

Деякі речовини нестабільні в розчинах і швидко розкладаються. Перед початком роботи з новою речовиною необхідно уважно вивчити наведену на етикетці інструкцію або інформацію про умови зберігання. Такі речовини, як, наприклад, β -меркаптоетанол додаються до розчину перед роботою і можуть зберігатися від кількох годин до кількох днів. Концентрований розчин β -меркаптоетанолу зберігають у темному місці на холоді (4-6 °C). Крім β -меркаптоетанолу, існує багато розчинів, які потрібно зберігати на холоді або в захищеному від світла місці. Нестабільні при кімнатній температурі розчини аскорбінової кислоти, персульфату амонію (АПС), пероксиду водню тощо. Такі розчини варто готувати безпосередньо перед роботою або зберігати в замороженому вигляді при мінус 20 °C. При мінусовій температурі треба також зберігати деякі вітаміни та

фітогормони – як у вигляді порошку, так і розчину. Розчини, які містять активні ферменти (рестриктази, лігази, полімерази та ін.), потрібно зберігати лише при мінус 20 °С. При цьому необхідно також враховувати, що деякі речовини можуть бути хімічно нестабільними при багаторазовому заморожуванні та розморожуванні. Зокрема, це особливо критично для розчинів з нуклеотидами. Тому їх необхідно зберігати у вигляді аліквот. Об'єм аліквоти повинен бути таким, щоб одна аліквота використовувалася повністю за один або два рази.

Певні розчини нестабільні при взаємодії з киснем повітря (наприклад, фенол, диетилпірокарбонат). Такі розчини зберігають під аргоном до відкриття пляшечки. Після цього їх або повністю використовують, або щільно закривають і заморожують, щоб звести до мінімуму контакт із повітрям.

Робота 1. Розрахунки кількості речовини для приготування розчинів

Мета роботи: навчитися розраховувати кількість речовини, необхідної для приготування розчинів певної концентрації.

Розрахуйте кількість речовини, яку необхідно взяти для приготування:

- 10 мл 5%-го розчину Na_2HPO_4 з сухого $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;
- 50 мл 7%-го розчину оцтової кислоти, якщо наявні вихідні 10% та 2%-й розчини оцтової кислоти;
- 250 мл 3 М NaCl з сухого NaCl ;
- 100 мл 5%-го розчину NaOH з 50%-м, питома вага якого 1,53;
- 1 кг 10% розчину CuSO_4 з $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Робота 2. Приготування розчинів заданої концентрації

Мета роботи: ознайомитися з порядком приготування розчинів. Приготувати розчини хлориду натрію різних концентрацій та перевірити правильність приготування за допомогою ареометра.

Обладнання та реактиви: ваги, ареометри, гумові рукавички, мірний циліндр, склянки, шпателі, скляні палички, сухий хлорид натрію, бідистильована вода.

Хід роботи

1. Розрахуйте кількість NaCl , необхідну для приготування 500 мл 4 М розчину.

2. Зважте розраховану кількість NaCl і насипте у склянку.

3. Налийте дистильованої води приблизно до мітки 450 мл.

4. За допомогою скляної палички (або магнітної мішалки) перемішайте розчин до повного розчинення солі.

5. Перелийте у циліндр і дистильованою водою доведіть об'єм розчину до мітки 500 мл. Перемішайте.

6. Обережно занурте ареометр у циліндр із розчином і відпустіть його. (УВАГА! При використанні ареометра необхідно одягати гумові рукавички, щоб не забруднити поверхню ареометра та розчин, у який його занурюють). Потрібно підібрати такий ареометр, щоб його шкала знаходилася на межі меніска розчину. Якщо ареометр плаває на поверхні, візьміть ареометр з наступними значеннями шкали. Показник шкали у місці перетину її меніском і є густиною даного розчину.

7. Перевірте за допомогою таблиці, чи густина розчину відповідає очікуваній концентрації (див. додаток Г, таблиця 2).

8. Розведіть розчин до 0,4 М і знову поміряйте його густину.

9. Порівняйте отримані значення з даними довідника.

Концентрація водневих іонів у розчинах

Молекули води та розчинених у ній речовин зазнають часткової або повної дисоціації та іонізації. У воді постійно відбувається процес дисоціації молекул води на водневі іони або протони (H^+) та гідроксильні іони (OH^-) і зворотне з'єднання цих іонів у недисоційовані молекули води. У чистій воді міститься однакова кількість водневих і гідроксильних іонів. Концентрація водневих іонів складає 10^{-7} моль/л. Кислоти у водних розчинах дисоціюють на водневий іон і негативно заряджений залишок кислоти, натомість луги – на гідроксильний іон і позитивно заряджений іон металу. Відповідно, в кислому середовищі концентрація водневих іонів більша, ніж концентрація гідроксильних іонів, а в лужному – менша. Концентрацію водневих іонів і кислотність розчину характеризують за допомогою безрозмірної величини рН, яка являє собою від'ємний десятковий логарифм числа, що показує концентрацію водневих іонів у молях на 1 л. Тобто, $\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$. Отже, рН чистої води або нейтрального водного розчину складає 7,0. Зі збільшенням абсолютної величини рН концентрація водневих іонів знижується, а зі зменшенням - зростає. Відповідно, розчини з рН нижче 7 вважаються кислотними, а розчини з рН вище 7 – лужними.

Величина рН відіграє важливу роль у біологічних системах: вона може змінюватися зі зміною фізіологічного стану клітини, від неї безпосередньо залежить активність ферментів. Тому зазвичай розчини та середовища, використовувані в біологічних дослідженнях, повинні мати певне значення рН. Для забезпечення стабільності рН під час дослідів часто застосовуються так звані буферні розчини.

Буферні розчини

Буферний розчин – це розчин, який має здатність підтримувати стабільний рівень рН. Неорганічні буферні розчини як правило являють собою суміші, які складаються із слабкої кислоти та солі цієї кислоти, що утворена сильною основою (напр., натрій-ацетатний буфер – див. додаток В, таблиця 2), або навпаки – сильної кислоти та солі цієї кислоти, що утворена слабкою основою. Буферні властивості також мають розчини солей багатоосновних кислот (напр., натрій-фосфатний або калій-фосфатний буфери).

Показник рН буферного розчину майже не змінюється при розведенні або додаванні до нього невеликої кількості кислоти чи лугу. Здатність буфера підтримувати певне значення рН пояснюється тим, що лише частина його молекул перебуває у повністю іонізованому стані. При додаванні кислоти або лугу кількість іонізованих молекул змінюється так, що рН розчину залишається незмінним. Проте здатність буфера підтримувати певне значення рН не безмежна: буфери різної хімічної природи відрізняються за кількістю кислоти або лугу, які можна додавати до них без суттєвої зміни рН. Тому й кажуть, що буфери мають різну буферну ємність. Буферна ємність розчину пропорційна концентрації буферних речовин. Кожний буфер має певний інтервал рН, у якому він виявляє свої властивості. Зазначимо, що рН деяких буферів сильно залежить від температури. Наприклад, рН буфера трис-НСІ помітно зміщується в кислу сторону при підвищенні температури (див. додаток Г, таблиця 4).

До буферів, які використовуються у біохімічних і молекулярно-біологічних дослідженнях, висуваються особливі вимоги. Зокрема, вони мають бути нетоксичними, не впливати на структуру та функцію біополімерів *in vitro* та не взаємодіяти з іншими компонентами середовища. Крім того, вони мусять виявляти буферні властивості при фізіологічних значеннях рН, тобто близьких до нейтральних або слабокислих. Історично в біохімічних дослідженнях спершу використовувалися прості неорганічні буфери, такі як натрій-

або калій-фосфатний, ацетатний та цитратний. Ці буфери інколи застосовують і сьогодні (див. додаток В, таблиця 2), хоча вони мають чимало недоліків, один із яких – порівняно низька буферна ємність. Пізніше почали широко застосовувати більш специфічні буфери на основі органічних сполук, таких як трис, HEPES, MOPS, PIPES, MES та інші. Найчастіше використовуються відносно недорогі буфери, які містять трис (трис- HCl , трис-ацетатний, трис-боратний, трис-фосфатний та ін.). Проте недоліком трису є його робочий інтервал pH , який знаходиться у слаболужній зоні (див. додаток Г, таблиця 3). Інші буфери забезпечують кисліші значення pH . Вони порівняно дорогі та спеціалізованіші: наприклад, HEPES використовують при проведенні чутливих ферментних реакцій, MES – при культивуванні рослин у стерильних умовах.

Визначення pH розчину

Для визначення pH є кілька методів, які ґрунтуються на колориметричних та електрометричних принципах. Зручний і швидкий колориметричний метод із використанням індикаторного паперу. Індикаторний папір, насичений розчином індикаторів, занурюють до повного змочування в розчин, pH якого треба визначити. Швидко витягають і порівнюють його забарвлення зі шкалою. Цей метод використовується для швидкого орієнтовного визначення pH у польових умовах і в експедиціях, у невеликих пробах матеріалу тощо. Точність цього методу не перевищує 0,1.

Для вивчення біохімічних процесів необхідно користуватися більш точними методами вимірювання, наприклад, електрометричним. Його точність становить 0,01. Метод ґрунтується на визначенні мембранного потенціалу між електродом, насиченим протонами, та рідиною, яка містить водневі іони. Величина цього потенціалу залежить від концентрації іонів водню у розчині. Для вимірювання pH електрод занурюють у розчин. Відхилення стрілки приладу або цифровий індикатор показує значення pH розчину.

Робота 3. Ознайомлення з властивостями буферних розчинів

Мета роботи: ознайомитися з принципом роботи рН-метра, навчитися готувати розчини заданого рН.

Обладнання та реактиви: вага, рН-метр, мірні циліндри, склянки, шпателі, скляні палички, сухий гідроксид калію, фосфат калію однозаміщений, хлорид калію, бідистильована вода.

Хід роботи

1. Приготуйте 100 мл 0,2 М K_2HPO_4 .
2. Приготуйте 50 мл 1 М КОН.
3. Налийте у склянку об'ємом 100 мл 50 мл 0,2 М K_2HPO_4 .
4. Підготуйте рН-метр до вимірювання. Для цього промийте електроди дистильованою водою та просушіть фільтрувальним папером (УВАГА! Не залишайте надовго електроди сухими).
5. Занурте електроди у склянку з K_2HPO_4 , запишіть значення рН.
6. Додайте 1 мл 1М КОН, добре перемішайте, запишіть значення рН буфера. Додавайте по 1 мл 1М КОН доти, поки рН буфера не досягне значення 9,5. Після додавання кожної порції лугу записуйте отримане значення рН.
7. Приготуйте 50 мл 3 М KCl і визначте рН розчину.
8. Додайте 1 мл 1М КОН, перемішайте, запишіть рН. Якщо рН суттєво не змінився, то додавайте КОН далі, як зазначено в пункті 6.
9. Побудуйте графік залежності рН розчинів від кількості доданого лугу. Порівняйте дані, отримані для розчинів K_2HPO_4 і KCl .

Рефрактометричний метод аналізу

Рефрактометр – прилад, який використовують для безпосереднього вимірювання показника заломлення рідких і твердих тіл. Основна робоча частина рефрактометра – призма, яка заломлює падаюче світло. Для визначення показника заломлення світла рідиною її наносять на поверхню призми. Враховуючи, що величина показника заломлення залежить від температури, усі вимірювання на рефрактометрі треба проводити за певної температури, наприклад 20 °С. Оскільки величина заломлення світла залежить від концентрації розчинених речовин, вимірювання показника заломлення може бути використане для визначення їхньої концентрації. Насамперед рефрактометри застосовують для визначення концентрації речовин, які мають високий коефіцієнт заломлення (сахароза, хлорид цезію тощо). Рефрактометрію широко використовують у хіміко-аналітичних лабораторіях виробничих підприємств науково-дослідних інститутів.

Робота 4. Визначення концентрації розчину за показником заломлення

Мета роботи: ознайомитися з принципом роботи рефрактометра. Визначити концентрацію розчину сахарози.

Обладнання та реактиви: рефрактометр, мірні циліндри, склянки, пробірки, шпателі, скляні палички, дистильована вода, 0,5 М розчин сахарози, розчини сахарози невідомої концентрації.

Хід роботи

А. Установка нуля-пункту рефрактометра

1. Перед початком роботи перевірте установку нуля-пункту рефрактометра. Для цього відкрийте верхню камеру, промийте поверхню призми дистильованою водою та протріть її насухо (УВАГА! Не подряпати поверхню призми!).

2. Скляною паличкою нанесіть краплину дистильованої води, закрийте камеру.

3. Спрямуйте промінь світла у віконце верхньої камери. Дивлячись в окуляр приладу, налаштуйте чітку межу світлотіні. Повертаючи ручку, змістіть межу білого та чорного полів так, щоб вона проходила через середину намальованого хреста. Для дистильованої води показник коефіцієнта заломлення на шкалі має складати 1,33299.

Б. Визначення показника заломлення розчину сахарози та побудова калібрувальної кривої.

1. Встановіть нуль-пункт рефрактометра.

2. Виміряйте показник заломлення 0,5 М розчину сахарози аналогічно до визначення коефіцієнта заломлення води (див. п. А).

3. Повторіть вимірювання двічі.

4. Виміряйте показники заломлення розчинів сахарози, розведених водою у 2, 5 та 10 разів.

5. Порівняйте отримані дані з даними із довідника.

6. Побудуйте калібрувальну криву.

В. Визначення процентної концентрації розчину сахарози

1. Встановіть нуль-пункт рефрактометра.

2. Виміряйте та запишіть показники заломлення трьох розчинів сахарози невідомої концентрації.

3. Визначте концентрацію сахарози в розчині з використанням калібрувальної кривої.

Центрифугування

Дослідження такої складної системи як жива клітина вимагає її фракціонування на окремі субклітинні компоненти, починаючи від органел і закінчуючи окремими макромолекулами. Тому цілком закономірно, що розробка й удосконалення методів центрифугування у 40-ві роки минулого століття зумовили суттєвий прогрес у розумінні процесів життєдіяльності на субклітинному рівні.

Центрифугування застосовується у тих випадках, якщо необхідно фракціонувати за розміром або за густиною частинки, які містяться в розчині у завислому стані. Для тонкого розділення органел або макромолекул використовують такі різновиди центрифугування, як диференційне, зонально-швидкісне та рівноважне. Центрифугування також використовується замість фільтрації. Це особливо зручно у тих випадках, коли необхідно уникнути контакту рідкої суміші з фільтром, оскільки при цьому відбуваються втрати рідини, яка просочує фільтр і залишається на ньому. Крім того, дрібні частинки можуть забивати пори фільтра. Найпростіший приклад застосування центрифугування – «освітлення» рослинного або тваринного гомогенату, тобто очищення його від уламків клітин і органел. Центрифугування може застосовуватися і для розділення двох рідких фаз наприклад, органічної та водної.

Теоретичні основи центрифугування

На частинки в пробірці, яка знаходиться у нерухомому стані, діє сила земного тяжіння (g). Під час обертання в центрифугі на частинки діє відцентрова сила, значно більша, ніж сила земного тяжіння. Величина відцентрових сил залежить від радіуса ротора та числа обертів за одиницю часу. Зазвичай при описі умов центрифугування вказують відносну відцентрову силу R , кратну силі тяжіння g .

$$R = 1,117 \times r \times N^2 \times 10^{-5},$$

де r – радіус обертання в см, N – число обертів за 1 хвилину.

Для швидкого переходу від числа обертів центрифуги до відносної відцентрової сили g зручно користуватися номограмою (див. додаток Д). Для цього необхідно з'єднати

прямою лінією величини радіуса обертання та швидкості обертання ротора. Місце перетину прямої з віссю g буде відповідати значенню відцентрової сили.

Під час центрифугування частинка, яка знаходиться в рідкому середовищі в пробірці, рухається вздовж радіуса з певною швидкістю. Ця швидкість залежить від трьох груп факторів: а) відцентрової сили (тобто радіуса та швидкості обертання); б) густини, в'язкості та хімічного складу середовища; в) від хімічної природи, густини, розміру та форми самої частинки.

Досить очевидно, що частинки з більшою густиною мають осідати швидше. Густина частинки в середовищі зумовлена не тільки її хімічним складом і просторовою будовою, але й кількістю зв'язаної з нею води. Ця вода рухається разом із частинкою, зменшуючи її ефективну густину. Якщо в середовищі наявні гідрофільні молекули або іони у високій концентрації, то кількість зв'язаної з частинками води зменшується, оскільки іони та гідрофільні молекули зв'язують воду, перешкоджаючи гідратації частинок. З іншого боку, деякі іони або молекули можуть зв'язуватися з частинками, збільшуючи їх ефективну густину. Отже, ефективна густина частинок залежить від хімічної природи та концентрації речовин, розчинених у середовищі, у якому ведеться центрифугування. Тобто йдеться про «плавучу густину» для даних частинок у певному середовищі. Плавуча густина одних і тих самих частинок змінюється залежно від складу середовища. Наприклад, плавуча густина ДНК у воді складає приблизно $1,1 \text{ г/см}^3$, а в концентрованому розчині CsCl – $1,7 \text{ г/см}^3$.

На частинку, котра рухається в середовищі під впливом відцентрової сили, в протилежному напрямку діє сила тертя, яка гальмує рух частинки. Ця сила залежить від в'язкості середовища: чим більша в'язкість, тим менша швидкість осідання частинок. Сила тертя залежить також від форми та

розміру частинок: рух дрібних частинок буде гальмуватися сильніше, оскільки вони мають відносно більшу поверхню. Отже, якщо дві частинки мають однакову густину, то частинки більшого розміру будуть осідати швидше. Але не варто забувати, що можлива ситуація, коли менші за розміром, але густіші частинки осідають швидше, ніж великі, але менш густі.

Отже, змінюючи склад і концентрацію компонентів середовища, можна впливати на поведінку частинок у бажаному напрямку.

Центрифуги та центрифужні пробірки

У біологічних дослідженнях використовуються центрифуги, які дають змогу працювати зі зразками, суттєво відмінними за об'ємом – від десятків мікролітрів до декількох літрів. Центрифуги бувають маленькі (настільні) та великі, котрі можуть важити кілька сотень кг. Крім розміру, центрифуги відрізняються за максимальною частотою обертання ротора. Сучасні ультрацентрифуги здатні розвивати швидкість до 50-60 000 об/хв, що (залежно від радіуса ротора) відповідає відцентровій силі до 200 000 g. Якщо виникає потреба відцентрифугувати проби за низьких температур, то використовують центрифуги з охолодженням або, якщо йдеться про малі об'єми, настільні центрифуги можна розмістити в холодильній камері.

У сучасних центрифугах застосовують ротори кількох типів, основні з яких бакетні та кутові. У бакетному роторі центрифужні пробірки вставляються у вільно підвішані центрифужні склянки або бакети (від англ. *bucket* – відро). Уже за найменших обертів бакети повертаються і займають горизонтальне положення. У такому роторі осад збирається на дні. Бакетні ротори використовують для центрифугування в градієнтах густини та для збирання осадів при диференційному центрифугуванні. У кутовому роторі

пробірки вставляють у гнізда, які під певним кутом зроблені в тілі ротора. При центрифугуванні у кутовому роторі частинки осідають спершу на стінку, а потім стікають на дно пробірки. Кутові ротори використовують для рівноважного центрифугування, а також для збирання осадів при диференційному центрифугуванні (див. нижче).

Центрифужні пробірки виготовляють переважно із поліпропілену, поліетилену, полікарбонату, нітроцелюлози, інколи зі скла. При виборі пробірок для центрифугування необхідно враховувати, з якого матеріалу вони зроблені, які речовини входять до складу середовища для центрифугування, при яких обертах і в якому роторі проводиться центрифугування. Скляні пробірки використовуються зрідка, оскільки на великій швидкості обертання вони легко тріскаються. Нітроцелюлозні пробірки прозорі, зручні для центрифугування у градієнті густини та для збирання матеріалу через проколювання дна пробірки або збоку, під потрібною зоною. Проте ці пробірки неміцні, їх не можна використовувати для центрифугування у надшвидкісних роторах (понад 50 000 об/хв). Недоліком таких пробірок є й те, що нітроцелюлоза легко адсорбує нуклеїнові кислоти. Цього можна уникнути, якщо пробірки вимочити протягом доби у 0,1 М розчині ЕДТА. Полікарбонатні пробірки теж прозорі, проте через велику товщину стінок непридатні для проколювання.

Пробірки всіх типів (крім скляних) не піддаються автоклавуванню, тому за необхідності їх стерилізують ультрафіолетовим опроміненням. Пробірки будь-якого типу можна використовувати для центрифугування водно-солевих розчинів, а також градієнтів сахарози, гліцеролу, фіколу та перколу. Треба бути обережними при центрифугуванні кислот, лугів і органічних розчинників. Полікарбонат не витримує цих речовин, а нітроцелюлоза витримує тільки контакт із толуолом і хлороформом. Поліпропіленові

пробірки стійкі до дії 10 %-х розчинів лугів, трихлороцтової кислоти (ТХО), етанолу, метанолу, ізопропанолу, диметилформаміду, диметил-сульфоксиду, проте в них не можна центрифугувати рідини, які містять фенол, хлороформ або ацетон. Стійкі до цих речовин поліетиленові пробірки, проте контакт із хлороформом вони витримують порівняно погано.

Диференційне центрифугування

Якщо неоднорідні частинки у складі суміші мають однакову або близьку плавучу густину (більшу, ніж густина розчину), то при їх розділенні вирішальну роль відіграють розміри. Цей принцип покладено в основу методу диференційного центрифугування. Перед початком центрифугування суспензію (наприклад, клітинний гомогенат) наливають у центрифужні пробірки: на цьому етапі всі частинки розподілені рівномірно по всьому об'єму проби, але при центрифугуванні частинки різного розміру будуть осідати з різною швидкістю. При досить тривалому центрифугуванні всі частинки осядуть на дно, але можна підібрати такі умови центрифугування (час і швидкість), за яких в осаді будуть міститися переважно великі частинки. Менші частинки залишаться в супернатанті (за винятком тих, що вже знаходились біля дна пробірки на початку центрифугування). Надосадову рідину можна обережно злити та відцентрифугувати довший час на більшій швидкості, щоб відокремити середні частинки у вигляді осаду від найдрібніших, які залишаються в супернатанті. Для отримання чистого осаду, без домішок дрібних частинок, його промивають. Для цього осад ресуспендують у середовищі центрифугування та знову центрифугують. Повторюючи цю операцію кілька разів, можна значно зменшити забруднення крупних частинок дрібними.

Отже, суть диференційного центрифугування частинок полягає в їх почерговому, роздільному осіданні на дно пробірки відповідно до їхнього розміру. Цей підхід часто застосовують для фракціонування клітинних органел: наприклад, з гомогенату рослинної клітини можна виділити ядрану, хлоропластну та мітохондріальну фракції.

Зонально-швидкісне центрифугування

Для фракціонування за розміром суміші частинок, густина яких набагато більша за густину середовища, можна застосовувати зонально-швидкісне центрифугування. Назви «швидкісне» пов'язана з тим, що розділення частинок відбувається за швидкістю осідання, а «зональне» – з тим, що частинки різних розмірів осідають окремими шарами, або зонами.

При застосуванні зонально-швидкісного центрифугування вихідну суміш частинок різного розміру (пробу) наносять тонким шаром на поверхню густішого середовища, яке знаходиться у центрифужній пробірці. Для цього виду центрифугування використовують винятково бакетні ротори. Під час центрифугування найважчі частинки швидко рухаються до дна пробірки, а за ними з відставанням, у вигляді дискретної зони рухаються дрібніші частинки. Після оптимального розподілу зон уздовж радіуса обертання центрифугування припиняють. Осади при цьому не утворюються, що відрізняє цей метод від диференціального центрифугування.

Щоб зони були вузькими, необхідно протидіяти конвекції рідини, у якій рухаються частинки. Цього можна досягнути, якщо збільшувати густину середовища вздовж радіуса обертання. Для цього створюють градієнт густини середовища, заповнюючи пробірку так, що концентрація середовища зростає в напрямку від поверхні до дна. Якщо

густина середовища, в якому рухаються частинки, змінюється за лінійним законом, то кажуть про лінійний градієнт концентрації. Крім лінійного, залежно від специфіки досліду, інколи застосовують градієнти, які мають складніший профіль.

У лабораторній практиці для створення градієнта густини використовують різні речовини, зокрема фікол, перкол, сахарозу, гліцерол тощо.

Фікол – полісахарид, розчинний у воді, стійкий у великому діапазоні рН. Великий розмір молекул перешкоджає проникненню його крізь клітинні мембрани. Тому він використовується для створення градієнта густини при центрифугуванні клітин, клітинних органел і частинок, зв'язаних із мембраною.

Перкол являє собою колоїдні частинки оксиду кремнію, покриті шаром полівінілпіролідону. Перкол застосовують лише для очищення клітин і досить крупних органел. Для фракціонування нуклеїнових кислот і білків фікол і перкол не застосовуються.

Сахароза – це інертна стабільна речовина. Сахарозний градієнт використовується для очищення білків і нуклеїнових кислот, а також клітинних органел. Зауважимо, що густина розчинів сахарози при збільшенні температури змінюється несуттєво (див. додаток Г, таблиця 5).

Метод зонально-швидкісного центрифугування використовується для фракціонування макромолекулярних комплексів великої маси, таких як рибосоми, їх окремі субчастинки тощо. Раніше цей метод також застосовували як для препаративного розділення, так і для аналітичного визначення молекулярної маси фрагментів ДНК і РНК. Проте в наш час у зв'язку із розробкою більш простих у роботі та дешевих методів гель-електрофорезу та хроматографії (гель-фільтрація, афінна хроматографія) центрифугування для цих цілей майже не застосовується.

Рівноважне центрифугування

Суміш частинок може бути розділена відповідно до їхньої плавучої густини з використанням рівноважного центрифугування. Цей метод полягає у створенні вздовж центрифужної пробірки градієнта концентрації певної речовини в такий спосіб, щоб густина середовища на дні була більшою, ніж у частинок із найбільшою густиною, а біля меніска – меншою, ніж у частинок із найменшою густиною. При центрифугуванні частинки рухатимуться вздовж градієнта, доки не досягнуть положення, у якому густина середовища збігається з їх плавучою густиною. При цьому частинки будуть рухатися до положення рівноваги з областями градієнта, які мають як найнижчу, так і найвищу густину, ніж плавуча густина частинок. Отже, в даному разі фракціонування відбудеться лише за густиною, тоді як розміри частинок та їхня маса не впливають на результати.

Для створення градієнта густини при рівноважному центрифугуванні застосовуються розчини солей важких елементів (CsCl , Cs_2SO_4 , KI). Завдяки великій атомній масі цих елементів немає потреби штучно створювати градієнт концентрації до початку досліду: пробу достатньо змішати з розчином обраної для експерименту солі та внести в пробірки.

Під час центрифугування під дією відцентрової сили встановлюється градієнт концентрації, у якому й відбувається перерозподіл молекул проби. Оскільки для цього потрібно багато часу, дослід зазвичай триває кілька годин.

Для рівноважного центрифугування застосовують кутові ротори або спеціальні ротори з вертикальним розміщенням пробірок.

Рівноважне центрифугування дозволяє ефективно очищувати ДНК від забруднень, оскільки ДНК, РНК, білки та полісахариди добре відрізняються за плавучою густиною в

розчинах цих солей. Крім того, ДНК можна фракціонувати за ступенем суперспіралізації та нуклеотидним складом, оскільки ці параметри впливають на плавучу густину. Відповідно, у 60–70-ті роки рівноважне центрифугування дуже широко використовувалось для вивчення сателітних ДНК – повторюваних послідовностей, які відрізняються від основної маси геномної ДНК за нуклеотидним складом.

Особливо варто згадати центрифугування з використанням ступінчастого градієнта густини. Для його отримання використовують набір розчинів різної концентрації, які нашаровують один на другий. Зрозуміло, що розчини вносять до пробірки в такому порядку, щоб їхня густина зменшувалась від дна до поверхні. Концентрації складових ступінчастого градієнта добирають так, щоб їх густини відповідали густинам різних частинок у складі суміші. На поверхню наносять пробу, яка підлягає фракціонуванню. При центрифугуванні частинки будуть рухатись уздовж пробірки, доки вони не досягнуть шару, густина якого дорівнює їх власній густині, після чого їх подальше просування припиниться. Частинки, густина яких менша, ніж початкова густина градієнта в центрифужній пробірці, взагалі не зможуть увійти в градієнт і залишаться на його поверхні, тоді як частинки з найбільшою густиною впадуть на дно центрифужної пробірки.

Для створення ступінчастого градієнта, як правило, використовують сахарозу. В умовах реального дослідження результати фракціонування частинок у ступінчастому градієнті залежать як від їхньої густини, так і від розміру. Тобто цей метод треба розглядати як комбінацію рівноважного та диференційного центрифугування. Центрифугування з використанням ступінчастого градієнта густини застосовується для виділення окремих клітинних органел, таких як ядра, хлоропласти, мітохондрії.

Правила роботи на центрифугах

При роботі з центрифугами потрібно дотримуватися правил безпеки та збереження центрифуг. Для запобігання нещасним випадкам через можливий викид реакційної суміші не можна заглядати в пробірки.

Категорично **ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ**:

- працювати на центрифугах, які не пройшли технічну перевірку;
- працювати на центрифугах без заземлення;
- працювати з роторами, котрі відпрацювали свій термін експлуатації;
- вмикати центрифугу без установленого та закріпленого ротора;
- працювати з відкритими кришками ротора та центрифуги;
- відкривати кришку центрифуги до повної зупинки ротора;
- розміщувати в роторі непарну кількість пробірок або невірноважені пари пробірок;
- працювати зі скляними пробірками при швидкостях, більших ніж 2 000-2 500 g;
- працювати зі скляними пробірками без гумових амортизаторів під ними;
- вмикати центрифугу на більш високі оберти, ніж указано в заводській інструкції або рекомендовано для даного типу ротора;
- залишати працюючу центрифугу без догляду.

Після роботи необхідно перевірити чистоту ротора. Якщо в роторі є залишки рідини, їх потрібно усунути. Не можна допускати механічні пошкодження ротора.

При центрифугуванні з охолодженням центрифугу після роботи залишають відкритою, щоб дати можливість висохнути краплям води, які утворюються в результаті конденсації. Закривати кришку можна тільки після повного висихання ротора та центрифужної камери.

Робота 5. Виділення клітинних органел методом центрифугування

Мета роботи: оволодіти методами диференційного центрифугування та центрифугування у ступінчастому градієнті густини.

Обладнання та реактиви: вага, центрифуга, мікроскоп, предметні скельця, пробірки для центрифугування, ступки та товкачки, шпателі, склянки, колбочки, циліндри, автоматичні піпетки з наконечниками, шприци, сухі сахароза, сульфат магнію, хлорид калію, бідистильована вода, 1 М розчин трис-НСІ (рН 7,5), β-меркаптоетанол, тритон Х-100, реактив Шиффа, проростки кукурудзи, пшениці або рослини тютюну.

Хід роботи

1. Приготуйте розчини, необхідні для роботи:

- 100 мл буфера для гомогенізації, який містить 0,5 М сахарозу, 5 мМ MgSO₄, 50 мМ KCl, 0,1 М трис-НСІ (рН 7,5), 1% β-меркаптоетанол;
- 50 мл 1,5 М сахарози на 50 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7,5;
- 50 мл 1,0 М сахарози на 50 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7,5;
- 50 мл 0,8 М сахарози на 50 мМ натрій -фосфатному буфері, рН 7,5.

2. 1 г рослинної наважки помістіть у ступку, залийте 2 мл буфера та гомогенізуйте за допомогою товкачика. Відділіть рідку фазу від залишків рослинної тканини, відфільтрувавши гомогенат через шар капрону в центрифужну пробірку.

3. Відцентрифугуйте рідку фазу в бакетному роторі при 250 g протягом 5 хв (наприклад, у центрифuzі ОПн-ЗУХЛ4.2 при 1 500 об/хв).

4. Обережно, не скаламутивши осад, витягніть пробірку. Отриманий осад являє собою ядра. Оскільки ядра є найбільшою клітинною органелою, то вони першими осідають при центрифугуванні.

5. Відберіть за допомогою пастерівської або автоматичної піпетки супернатант, перенесіть його в чисту пробірку та зберігайте на льоду для подальшого виділення хлоропластів (див. п. 11).

6. Промийте осад ядер від домішок хлоропластів та уламків клітинних стінок. Для цього обережно ресуспендуйте ядра в буфері для гомогенізації, який додатково містить тритон X-100 у концентрації 0,1 %. Відцентрифугуйте 5 хв при 250 g.

7. Повторіть промивання ядер 2-3 рази до зникнення зеленого забарвлення супернатанту.

8. Ресуспендуйте ядра в 100 мкл буфера для гомогенізації.

9. Нанесіть скляною паличкою краплину суспензії на предметне скло та додайте 30-40 мкл реактиву Шиффа. Помістіть предметне скло у вологу камеру та проінкубуйте протягом 2 годин.

10. Розгляньте забарвлену пробу ядер під мікроскопом при 400-600- кратному збільшенні.

11. Для виділення хлоропластів використайте супернатант, отриманий у пункті 5. Для очищення хлоропластів проведіть центрифугування в ступінчастому сахарозному градієнті. Для цього в скляну центрифужну пробірку налийте 3 мл 1,5 М сахарози, потім за допомогою піпетки обережно по стінці нашаруйте 3 мл 1,0 М сахарози та 3 мл 0,8 М сахарози. Зверху нашаруйте супернатант, отриманий у пункті 5.

12. Урівноважте пробірки та відцентрифугуйте їх у бакетному роторі при 1000 g протягом 20 хв (3000 об/хв, центрифуга ОПн-ЗУХЛ4.2.).

13. Отримані після центрифугування окремі зони хлоропластів відберіть шприцом.

Різні за величиною фрагменти хлоропластів і цілі хлоропласти розподіляються по фракціях так:

- фракція 1 – знаходиться на межі між 0,8 М та 0,5 М сахарозою; містить в основному фрагменти хлоропластів;
- фракція 2 – знаходиться на поверхні 1 М сахарози, суспензія хлоропластів із великою кількістю середніх хлоропластів і домішками крупних хлоропластів і фрагментів;
- фракція 3 – плаває на поверхні 1,5 М сахарози, містить цілі великі хлоропласти, фрагментів немає .

14. Нанесіть на предметне скло краплину суспензії хлоропластів і розгляньте під мікроскопом.

15. Додайте до краплини під мікроскопом 100 мкл дистильованої води. Спостерігайте за змінами хлоропластів при зміні осмотичного тиску буфера.

Примітка: Якщо для подальших досліджень необхідно мати функціонально активні органели, то всі маніпуляції з їх виділення треба проводити при 4 °С.

Робота 6. Приготування та фракціонування лінійного градієнта густини сахарози

Мета роботи: ознайомитися з методами фракціонування у градієнті густини. Приготувати сахарозний градієнт і визначити зміну концентрації сахарози вздовж пробірки.

Обладнання та реактиви: вага, перистальтичний насос, рефрактометр, стакани, мірні циліндри, шпателі, пробірки для приготування сахарозного градієнта, плашки для збирання фракцій, суха сахароза, бідистильована вода.

Хід роботи

1. Приготуйте 100 мл 20%-го розчину сахарози та залийте у дві центрифужні пробірки по 20 мл (одна пробірка – дослід, друга – контроль). Заморозьте вміст пробірок на мінус 20 °С.

2. Приготуйте 100 мл 5%-го розчину сахарози та налейте його зверху на заморожений шар 20 %-го розчину. Заморозьте на мінус 20 °С.

3. Після заморожування обох шарів сахарози, витягніть дослідну пробірку з морозильника та залишіть у штативі при кімнатній температурі на 4–5 годин. При цьому після розморожування за рахунок дифузії відбувається формування лінійного градієнта концентрації сахарози. Оптимальний час, необхідний для утворення градієнта, добирають емпірично у попередніх дослідах.

4. Витягніть із морозильника контрольну пробірку та залишіть за кімнатної температури, доки сахароза в ній розморозиться (1 година). Після цього зразу ж переходьте до наступного пункту.

5. Обережно опустіть на дно контрольної пробірки тонкий шланг, під'єднаний до перистальтичного насоса. Увімкніть насос і зберіть фракції по 20 крапель у лунки плашки.

6. Відфракціонуйте дослідну пробірку, як описано вище.

7. Виміряйте за допомогою рефрактометра концентрацію сахарози в кожній фракції.

8. Порівняйте розподіл концентрацій сахарози вздовж пробірки в контролі та досліді.

Спектрометричний аналіз

Залежно від хімічної будови речовини здатні поглинати світло певної довжини хвилі. Тому спектральні характеристики можуть застосовуватися для ідентифікації речовин або для доведення наявності окремих хімічних груп у складі молекули.

Згідно із законом Бугера-Ламберта-Бера, поглинання (адсорбція) світла розчином описується формулою

$$I=I_0e^{-kcd},$$

де I_0 – інтенсивність падаючого світла, I – інтенсивність світла після проходження через розчин, k – коефіцієнт екстинкції, c – концентрація речовини у розчині, d – товщина шару рідини. Коефіцієнт екстинкції k специфічний для кожної речовини та визначається для певної довжини хвилі світла. Він не залежить від початкової інтенсивності світла I_0 та концентрації c при малих її значеннях, проте для великих концентрацій закон не виконується.

У лабораторній практиці вимірювання адсорбції розчинів використовуються для визначення концентрації розчинених речовин. Для вимірювання обирають довжину хвилі, яка відповідає максимуму поглинання. Це підвищує чутливість методу та дозволяє визначати концентрацію окремих компонентів суміші незалежно від наявності інших.

Для вимірювання концентрації ДНК і РНК застосовують вимірювання адсорбції розчину при довжині хвилі 260 нм, що відповідає максимуму поглинання азотистих основ нуклеїнових кислот. Концентрацію білків можна визначати за поглинанням світла при довжині хвилі 206–215 нм, що відповідає максимуму поглинання пептидного зв'язку, або при 280 нм за рахунок наявності в білковій молекулі ароматичних амінокислот. В останньому випадку треба враховувати, що амінокислотний склад білка буде впливати на результати вимірювань. Ґрунтуючись на адсорбційному спектрі, можна також оцінити чистоту досліджуваної речовини та наявність певних домішок. Наприклад, якість препарату ДНК оцінюють, порівнюючи поглинання світла при 230 нм (максимум поглинання полісахаридів), 260 нм та 280 нм. Співвідношення адсорбцій для ДНК, незабрудненої полісахаридами, має складати $A^{260} / A^{230} > 2,0$, а для незабрудненої білками – $A^{260} / A^{280} > 1,8$.

Вимірювання адсорбції розчинів проводять за допомогою спектрофотометра або фотоелектроколориметра (ФЕК). Основними робочими елементами цих приладів є джерело

світла певної довжини хвилі та фотоелемент, у якому після попадання світла збуджується електричний струм. Зазвичай у спектрофотометрах застосовують два джерела світла, одне з яких випромінює світло переважно в ультрафіолетовій, а друге – у видимій частинах спектра. Крім того, застосовується монохроматор - пристрій, який дає змогу обирати будь-яку бажану довжину хвилі, тоді як у ФЕК для цього використовується набір світлофільтрів. Тому на ФЕК вимірювання можна проводити лише для фіксованого набору довжин хвиль. Вимірювання у видимій області проводять у скляних кюветах, а в ультрафіолетовій – у кварцових, оскільки скло непрозоре для ультрафіолетових променів. Можуть також використовуватись одноразові пластикові кювети.

Величина струму у фотоелементі прямо пропорційна інтенсивності падаючого світла. Якщо між джерелом світла та фотоелементом розміщений розчин, який поглинає частину світла, то це впливає на силу фотоструму. Тож, вимірюючи величину фотоструму, можна визначити концентрацію речовини в досліджуваному розчині. Існують фотоелементи, які дають можливість проводити вимірювання як у видимій, так і в ультрафіолетовій областях спектра.

Робота 7. Визначення оптимальної довжини хвилі для вимірювання на спектрофотометрі та фотокolorиметрі

Мета роботи: ознайомитися з методами вимірювання оптичної адсорбції розчинів. Зняти спектр поглинання білка та ДНК. Знайти оптимум поглинання для різних барвників, побудувати калібрувальний графік і визначити концентрацію невідомого розчину.

Обладнання та реактиви: вага, спектрофотометр, ФЕК, кварцові та скляні кювети з довжиною оптичного шляху 1 см, склянки, мірні пробірки, шпателі, ліофілізований бичачий

альбумін, розчин ДНК (15 мкг/мл), $0,1 \times 10^{-2} \%$ розчин еозину, $0,1 \times 10^{-3} \%$ розчин діамантового зеленого, $0,4 \times 10^{-3} \%$ розчин фукурцину.

Хід роботи

А. Робота з спектрофотометром

1. Увімкніть спектрофотометр і дейтерієву лампу для прогрівання за 25-30 хв до початку роботи.
2. Приготуйте 10 мл 1%-го розчину альбуміну.
3. Вставте у спектрофотометр контрольну кювету та при довжині хвилі 210 нм виведіть на приладі нуль.
4. Налийте розчин альбуміну в другу, дослідну, кювету, вставте її у спектрофотометр, заміряйте та запишіть показник оптичної густини.
5. Для зняття спектра поглинання білка повторіть пункти 3 та 4 для різних довжин хвиль – 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310 та 320 нм. Запишіть показники оптичної густини для кожної довжини хвилі.
6. Побудуйте графік залежності оптичної густини розчину білка від довжини хвилі.
7. Визначте, яка довжина хвилі відповідає максимуму поглинання.
8. Аналогічно побудуйте спектр поглинання ДНК.

Б. Робота з ФЕК

1. Перед початком роботи увімкніть прилад для прогрівання на 30 хв.
2. Приготуйте із вихідних розчинів еозину, діамантового зеленого та фукурцину по 10 мл розведення у 2, 3, 4, 5 та 10 разів.
3. Налийте в кювету розчин еозину, розведений у 5 разів. Виміряйте та запишіть показники ФЕК, використовуючи усі світлофільтри. Визначте світлофільтр, який відповідає найвищому показнику оптичної густини.

4. Аналогічно визначте світлофільтр, що відповідає максимальному поглинанню світла для діамантового зеленого та фуорцину.

5. Застосовуючи відповідний оптимальний світлофільтр, виміряйте оптичну густину для серії розведень кожного з трьох барвників.

6. Побудуйте калібрувальну криву, використовуючи отримані дані.

7. Виміряйте оптичну густину для розчину еозину (діамантового зеленого, фуорцину) невідомої концентрації.

8. Визначте концентрації невідомих розчинів, використовуючи калібрувальний графік.

Хроматографія

Хроматографія – це метод фракціонування сумішей. Хроматографічні методи займають центральне місце серед лабораторних методів очищення та фракціонування. Принцип методу полягає в тому, що у двофазній системі всі речовини здатні з певними концентраціями розподілятися між двома фазами. Співвідношення цих концентрацій визначається коефіцієнтом розподілу, специфічним для кожної речовини, і залежить від її фізико-хімічних властивостей. При хроматографії речовини, які підлягають розподілу, рухаються у двофазній системі, яка складається з нерухомої фази, закріпленої на тому чи іншому носії, та рухомої фази, яка переміщується відносно нерухомої з певною швидкістю в одному напрямку. Нерухома фаза може бути твердою або рідкою, рухома фаза – рідкою або газоподібною. Відповідно до того, яка рухома фаза, розрізняють рідинну та газову хроматографію. Для фракціонування нуклеїнових кислот і білків застосовують рідинну хроматографію, а для низькомолекулярних сполук – як рідинну, так і газову.

У молекулярній біології та біохімії широко застосовується рідинна хроматографія на колонках. У цьому випадку нерухома фаза являє собою маленькі гранули з певного матеріалу (хроматографічний носій, або сорбент), якими заповнюють скляну чи металеву трубку (хроматографічну колонку). При застосуванні хроматографії у тонкому шарі хроматографічний носій фіксується на поверхні скляної або пластикової пластинки.

На початку експерименту до хроматографічної колонки вносять суміш речовин, яка підлягає розділенню. При цьому відповідно до коефіцієнтів розподілу молекули суміші розподіляються між сорбентом і рухомою фазою (розчинником, або елюентом) у верхній частині колонки. Важливо, щоб сила взаємодії між сорбентом і молекулами проби була оптимальною. При відсутності взаємодії молекули будуть проходити через колонку, не затримуючись і не розділяючись, тоді як при дуже сильній взаємодії сорбція молекул проби може стати незворотною.

Протягом експерименту на колонку подається чистий елюент, який змушує рухому фазу разом із розчиненими у ній молекулами проби рухатися (мігрувати) вздовж колонки, що викликає перерозподіл молекул між сорбентом і елюентом. У результаті компоненти суміші, які мають відносно високу спорідненість із рухомою фазою, проходять через колонку швидше, а компоненти, які відносно сильніше взаємодіють з нерухомою фазою, затримуються на колонці. Це і дозволяє розділити компоненти суміші.

Залежно від тиску, при якому відбувається хроматографічне розділення на колонці, розрізняють

- хроматографію при низькому тиску
- HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) – хроматографію за умов підвищеного тиску від 100 до 300 бар.

За принципом фракціонування розрізняють такі варіанти хроматографії:

- гель-фільтрація;
- розподільна хроматографія;
- адсорбційна хроматографія;
- іонообмінна хроматографія;
- афінна хроматографія.

Гель-фільтрація

Цей метод використовується для розділення суміші молекул залежно від маси та форми. Для цього речовини, що фракціонуються, не повинні мати специфічної спорідненості з нерухомою або рухомою фазою. Нерухома фаза при гель-фільтрації являє собою рідину, що знаходиться всередині пористих гранул, які добре змочені та заповнюють хроматографічну колонку. Розмір пор у гранулах близький до розміру молекул, які мають бути розділені. Проте частина пор має дещо більші, а частина – дещо менші розміри. Якщо на таку колонку нанести розчинену в елюенті суміш молекул різних розмірів, то вони будуть рухатися через колонку з різною швидкістю. Це пов'язано з тим, що для найбільших за розміром молекул пори в гранулах замалі, тобто для них доступний лише простір між гранулами. Такі молекули будуть рухатись уздовж колонки разом із рухомою фазою. Малі ж молекули, навпаки, вільно потраплятимуть через пори у гранули. Вони будуть рівномірно розподілятися між рухомою та нерухомою фазами. У результаті шлях їх до виходу з колонки буде довшим, ніж у молекул великого розміру.

Для молекул проміжного розміру завдяки статистичному розподілу розміру пор у гранулах доступна лише частина об'єму нерухомої фази. Тобто відбуватиметься фракціонування вихідної суміші молекул залежно від їхнього розміру.

Отже, фракції виходитимуть із колонки в порядку зменшення розмірів молекул: найбільші молекули потраплять у перші фракції, а найдрібніші – в останні (рис.1).

Використовуючи гель-фільтрацію, проводять фракціонування молекул біополімерів (нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів) за розміром та їх очищення від низькомолекулярних компонентів, зокрема знесолювання розчинів біополімерів.

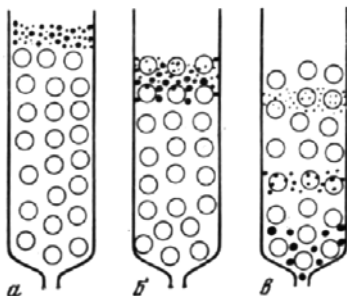


Рис. 1. Фракціонування молекул різного розміру методом гель-фільтрації.
а – момент нанесення суміші на колонку;
б – початок фракціонування;
в – початок виходу з колонки фракції найбільш крупних молекул.

Розподільна хроматографія

У цьому разі рухома та нерухома фази представлені рідинами, які не змішуються або лише частково змішуються. Нерухомість однієї з фаз зумовлена її зв'язком з твердою матрицею, що заповнює хроматографічну колонку. Цей вид хроматографії базується на явищі розчинності. Якщо в системі двох рідин, які контактують між собою, розчиняти будь-яку речовину, то молекули речовини будуть переходити з однієї рідини в іншу, доки не настане рівновага, якій відповідає більша концентрація молекул у тій рідині, розчинювальна здатність якої більша. Якщо дві такі рідини є відповідно рухомою та нерухомою фазами, то розподіл між ними молекул суміші речовин відбувається згідно з їх індивідуальними розчинностями. При цьому кожен компонент суміші розподіляється незалежно від іншого. У хроматографічному процесі компоненти суміші, яка фракціонується, зазвичай краще розчинні в нерухомій фазі, ніж у рухомій. Чим більша спорідненість компонента з нерухомою фазою, тим повільніше він мігрує вздовж колонки.

Рідина нерухомої фази може бути іммобілізована всередині пористих гранул, як у разі гель-фільтрації, або бути зв'язана з волокнами набряклої целюлози. Часто одна із фаз представлена органічними розчинниками або водно-органічними сумішами, тоді як інша фаза – водна. Звичайно нерухомою є водна фаза, а рухомою – органічна. У такому разі фракціонування речовин відбувається за ступенем їх гідрофільності. Таку хроматографію називають *нормальнофазовою*. Якщо як нерухома фазу використовують органічний розчинник, а рухома фаза представлена водним або буферним розчином із полярністю більшою, ніж у нерухомої фази, то кажуть про *хроматографію у зворотних фазах*. Розподіл компонентів відбувається за ступенем їх гідрофобності.

Адсорбційна хроматографія

У цьому разі нерухома фаза являє собою твердий сорбент. Якщо речовини мають різний коефіцієнт адсорбції, то вони будуть по-різному розподілятися між сорбентом і рухомою рідкою фазою. Рівновага процесів сорбції та десорбції встановлюється для кожного компонента суміші незалежно один від одного. Чим більшу спорідненість із сорбентом має речовина, тим повільніше вона буде мігрувати вздовж колонки. Якщо сорбція відбувається тільки на зовнішній поверхні суцільних гранул, то це є чиста адсорбційна хроматографія. Якщо ж сорбент має пористу структуру, то речовини затримуються в нерухомій фазі ще й за рахунок дифузії всередину пор.

У процесі сорбції речовини на поверхні сорбенту діють кілька типів фізичних взаємодій між молекулами:

- *дипольні взаємодії*, які виникають унаслідок дії електричного поля, яке виникає навколо сорбенту або речовини, або обох одразу;

- *Ван-дер-Ваальсові дисперсійні сили* тяжіння, які діють на дуже малих відстанях;
- *водневі зв'язки*, які виникають у результаті взаємодії атома водню, ковалентно зв'язаного з електронегативним атомом, з іншим негативно зарядженим атомом, що має неподілену пару електронів;
- *іонні сили*, тобто сили електростатичного тяжіння між іонами сорбенту, іонами речовини та елюенту.

Іонообмінна хроматографія

Нерухома фаза – це тверда поверхня гранул сорбенту, яка покрита ковалентно зв'язаними нею іоногенними групами. Рухома фаза (елюент) завжди водна. Головні її фізичні параметри – рН, концентрація та природа розчинених солей. Речовини, що фракціонуються, повинні завжди нести електричний заряд або мати здатність до іонізації. Якщо молекули компонентів, які необхідно фракціонувати, мають протилежний до сорбенту заряд, то вони взаємодіють з нерухомими іоногенними групами на його поверхні і в такий спосіб залишаються фіксованими в нерухомій фазі. Розподіл речовини між фазами (і отже, швидкість переміщення компонентів суміші вздовж хроматографічної колонки) залежить від сили електростатичної взаємодії іонів або заряджених груп молекул речовини із зарядженими групами сорбенту. Ця взаємодія визначається природою самої речовини (й обмінника), а також властивостями рідкого середовища, у якому вона відбувається, зокрема рН, вмістом контріонів, які нейтралізують заряд, і наявністю специфічних домішок.

Зв'язок між молекулами речовини та сорбентом зворотний: іони одних компонентів можуть заміщуватися на іони інших або витіснятися контріонами іоногенних груп сорбенту, які знаходяться в елюенті, а також іонами, які можуть додатково уводитись у середовище для цієї мети.

Оскільки в процесі хроматографічного розділення має місце обмін іонів між сорбентом і рухомою фазою, такі сорбенти називають іонообмінниками.

Афінна хроматографія

По суті афінна хроматографія – це особливий тип адсорбційної хроматографії. Адсорбція тут здійснюється завдяки біоспецифічній взаємодії між молекулами, закріпленими на матриці (тобто зв'язаними з нерухомою фазою) та комплементарними до них молекулами, які знаходяться в рухомій фазі. Така взаємодія існує, наприклад, між ферментом та його субстратом або інгібітором, антигеном та антитілом, гормоном та рецептором тощо. Процесом такої взаємодії можна керувати, змінюючи умови сорбції, наприклад, вводячи в елюент солі, детергенти, конкуруючі молекули або змінюючи його рН.

Афінна хроматографія відрізняється великою вибірковістю, властивою біологічним взаємодіям. Очищення білків або нуклеїнових кислот на афінних сорбентах часто проводять не на колонках, а в об'ємі – методом центрифугування.

Матеріали матриць для хроматографії

Матрицею називають основу нерухомої хроматографічної фази (сорбенту). На властивості сорбенту при хроматографії на колонках можуть впливати розміри та форма гранул і їхніх пор, механічна міцність матеріалу матриці, характер змочування та набрякання в елюенті, хімічна стійкість та інертність в умовах хроматографічної елюції. Щоб надати матриці властивостей, необхідних для хроматографії, її модифікують, приєднуючи іоногенні групи, гідрофобні молекули, біологічно активні речовини тощо. Для розділення нуклеїнових кислот і білків як матриці застосовуються целюлоза, декстран і агароза.

Целюлоза – це лінійний полісахарид, утворений залишками глюкози (рис. 2). Для целюлози характерний високий ступінь гідрофільності та здатність до утворення численних водневих зв'язків між нитками полімеру.

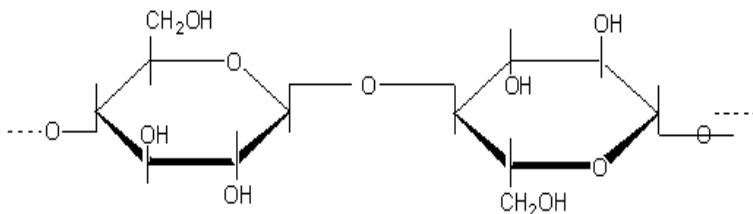


Рис. 2. Хімічна будова целюлози

Наявність вільних гідроксильних груп дає можливість легко модифікувати целюлозу. Хімічно целюлоза досить інертна, не вступає в реакції з білками та нуклеїновими кислотами. Целюлоза нестійка до дії сильних кислот, лугів і окиснювачів. Водневі зв'язки між лінійними ланцюгами целюлози можуть утворювати псевдокристалічні структури, які чергуються з більш пухкими ділянками. Кристалічні ділянки малодоступні для приєднання модифікуючих замінників. У результаті утворюється мікрогетерогенна структура, яка залежить від вихідного матеріалу та технології обробки. Властивості целюлози можуть варіювати від партії до партії, що необхідно враховувати при встановленні режиму хроматографії.

Сефадекс – це гель на основі декстрану, який являє собою лінійний полімер на основі глюкози (рис. 3). Подібно до целюлози він має високий ступінь гідрофільності, великі можливості для модифікації та хімічно інертний. Стійкість до дії кислот у сефадексу ще менша, ніж у целюлози. У гелях для хроматографії нитки декстрану зшиті епіхлоргідрином.

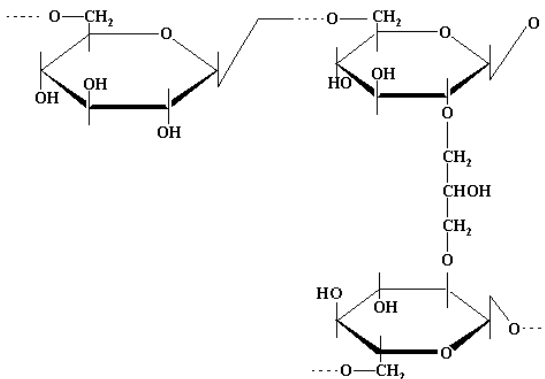


Рис. 3. Хімічна будова сефадексу

Сефадекси відносно м'які, легко стискаються, у водних розчинах легко набрякають. Змінюючи процентний вміст епіхлоргідрину, можна регулювати ступінь зшивання, а отже, і розмір пор, утворених просторовою сіткою зшитого гелю. Зшивки статистично розподіляються по об'єму гелю, тому сефадекси гомогенніші, а їхні властивості відтворюються краще, ніж у целюлози.

При використанні іонообмінників на основі сефадексу часом виникають певні ускладнення при проведенні хроматографії, оскільки вони можуть деформуватися безпосередньо в колонці через зміну сили електростатичного відштовхування своїх іоногенних груп залежно від іонної сили елюенту.

Як матрицю для хроматографії також використовують *агарозу*, лінійний полісахаридом, елементарна ланка якого – дисахарид агаробіоза, яка складається із залишків D-галактози та 3,6-ангідро-L-галактози (рис. 4). Агарозу виробляють з агару – складної суміші полісахаридів, яку отримують з червоних водоростей родів *Gelidiopsis*, *Gelidium*, *Gracillaria* та деяких інших. Головними складовими агару є агароза та агаропектин.

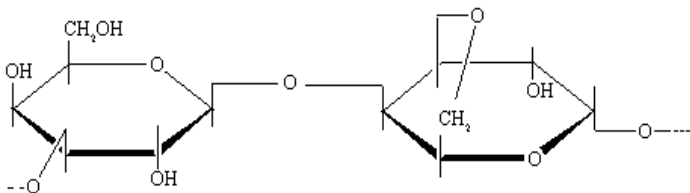


Рис. 4. Хімічна будова агарози

Агароза дуже гідрофільна, її полімерні нитки ще більше, ніж у целюлози схильні до утворення водневих зв'язків. Гранульована агароза, ланцюги якої додатково стабілізовані поперечними зшивками, продається під торговою назвою Sepharose і використовується як матриця для хроматографії. Крім хроматографії, агароза широко використовується для отримання гелю, який застосовують як матриця при проведенні електрофорезу, імунодифузії тощо.

Робота 8. Гель-фільтрація на сефадексі

Мета роботи: ознайомитися з хроматографічними методами. Розділити суміш барвників (бромфеноловий синій та еозин) на компоненти методом гель-фільтрації.

Обладнання та реактиви: хроматографічні колонки Bio-Rad, склянки, автоматичні мікропіпетки з наконечниками, плашки для збирання фракцій, сухий сефадекс G-75 та G-200, буфер ТЕ (10 мМ трис-НСl, рН 7,4, 1 мМ ЕДТА-Na, рН 8,0), суміш барвників (0,25% бромфеноловий синій та 0,001 %-й еозин, 1:1).

Хід роботи

1. Повільно додайте 3 г сухого сефадексу до 25 мл буфера ТЕ, рН 8,0. Залиште для набрякання на ніч при кімнатній температурі.

2. Приготуйте хроматографічну колонку та заповніть її сефадексом. Для цього обережно перемішайте гранули сефадексу з рідиною, яка розміщена над ним, і обережно залийте цю суспензію у хроматографічну колонку до повного заповнення резервуару.

3. Почекайте, доки сефадекс осяде і встановиться чітка межа між сефадексом і буфером.

4. Відкрийте кран на шлангу внизу колонки для протікання буфера. Промийте колонку двома об'ємами буфера ТЕ, обережно підливаючи його у колонку.

5. Нанесіть на колонку 200 мкл суміші барвників. Почекайте, доки розчин барвників повністю зайде у сефадекс.

6. Обережно, щоб не збовтати сефадекс, заповніть резервуар колонки буфером ТЕ. Зберіть 10–15 фракцій у лунки плашки по 15 крапель у кожную.

7. Виміряйте на ФЕК значення показників оптичної густини у кожній фракції. Вимірювання проведіть при довжині хвилі 590 нм для бромфенолового синього та 540 нм для еозину. Запишіть показники ФЕК та побудуйте графік залежності оптичної густини фракцій від їх номера.

8. Порівняйте результати, отримані при використанні сефадексів G-50 та G-250.

Запитання та завдання для самоконтролю

1. Що таке розчин?
2. Що таке концентрація розчину? Які способи вираження концентрації Ви знаєте?
3. Як готуються багатоконпонентні розчини?
4. Які бувають типи ваг?
5. Чому виникає необхідність виміряти густину розчину?
6. Що таке ареометр, який принцип його роботи?
7. Що таке рН розчину?
8. Чому потрібно слідкувати за рН розчину при зміні його температури?
9. Який принцип роботи рН метра?
10. Що таке буферна ємність?
11. Як правильно зберігати розчини?
12. Чому виникає необхідність роботи у стерильних умовах?
13. Які методи стерилізації ви знаєте? У чому полягає їх принцип?
14. Чому пластикові предмети (наконечники, пробірки тощо) не можна стерилізувати сухим гарячим повітрям?
15. Як можна простерилізувати інструменти для роботи?
16. Що таке рефрактометр? Який принцип його роботи?
17. Що таке рівноважне центрифугування?
18. Опишіть зонально-швидкісне центрифугування.
19. Дайте характеристику диференційного центрифугування.
20. Які речовини використовуються для створення градієнта густини?
21. Які типи роторів бувають?
22. Яких правил треба дотримуватись при роботі на центрифугах?
23. Що таке лінійний градієнт густини, для чого він використовується в лабораторній практиці?

24. Що таке ступінчастий градієнт густини, для чого він використовується?

25. Які фізико-хімічні властивості речовин мають значення при використанні їх для створення градієнта густини? Чому?

26. Як можна створити градієнт густини речовини в пробірці? Наведіть приклади.

27. У чому полягає принцип вимірювання на спектрофотометрі та фотоколориметрі?

28. Які кювети використовуються для вимірювання в ультрафіолетовій області?

31. Яку довжину хвилі використовують для вимірювання концентрації нуклеїнових кислот? Чому?

32. Як за допомогою спектрофотометра можна оцінити чистоту ДНК?

33. Що таке хроматографія, для чого її застосовують?

34. Які бувають типи хроматографії за принципом фракціонування? Дайте характеристику кожного з них.

35. Опишіть класифікацію хроматографії за розташуванням нерухомої фази.

29. Що описує закон Бугера-Ламберта-Бера?

30. Від чого залежить коефіцієнт екстинкції?

НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ МЕТАБОЛІТИ

Визначення вмісту низькомолекулярних метаболітів

Обмін речовин у рослин набагато складніший, ніж у тварин. При проведенні біохімічних досліджень важливим завданням є визначення вмісту (концентрації) певних речовин (метаболітів) у клітинах/тканинах/органах рослинного організму. Для цього традиційно застосовують методики, які складаються з (1) екстракції необхідної речовини та (2) визначення її вмісту в отриманому екстракті з використанням спектрометричних або інших методів.

Екстракція низькомолекулярних метаболітів

Екстракція має проводитись за умов, які забезпечують кількісне виділення досліджуваної сполуки з рослинного матеріалу та запобігають її втратам внаслідок неконтрольованих хімічних перетворень, які можуть відбуватися між компонентами екстракту, екстрагентом та повітрям. Першим кроком приготування екстракту є фіксація та гомогенізація (подрібнення) досліджуваного матеріалу.

Зручним методом фіксації рослинного матеріалу є його заморожування у рідкому азоті, що дає змогу швидко зупинити всі біохімічні реакції. Якщо планується зберігати матеріал у замороженому вигляді, то його зручно заливати рідким азотом безпосередньо в пластиковій пробірці, у який він буде зберігатись. Для зменшення можливої взаємодії метаболітів із киснем повітря заморожений матеріал варто подрібнювати лише безпосередньо перед проведенням екстракції.

Гомогенізацію рослинного матеріалу найкраще проводити в замороженому вигляді, оскільки тканини стають крихкими і легко руйнуються. Для цього досліджуваний зразок заливають рідким азотом та ретельно подрібнюють у ступці за допомогою товкачика. Заливати зразок тканини рідким азотом можна безпосередньо у ступці.

Не варто допускати розморожування матеріалу за відсутності екстракційної суміші, оскільки це призводить до неконтрольованої активації багатьох ферментів, які будуть взаємодіяти із метаболітами та змінювати їх концентрації у зразку. Для запобігання цьому потрібно використовувати екстракційні суміші, склад яких добирають з урахуванням хімічних властивостей досліджуваних речовин. Екстракційна суміш не має взаємодіяти з метаболітами, а навпаки – максимально їх стабілізувати.

Для екстракції широко використовують водні буферні розчини (фосфатні, трисові тощо), рН яких обирають залежно від задач експерименту. У буфер можна додатково вводити інгібітори, наприклад, ЕДТА, який зв'язує бівалентні катіони і тим самим інгібує активність металозалежних ферментів. Крім того, для екстракції використовують водні розчини багатьох кислот, наприклад, трихлороцтової (ТХО), хлоридної (HCl), перхлоратної (HClO₄), ортофосфатної (H₃PO₄), сульфосаліцилової тощо.

Перевага таких екстрагентів – денатурація (а отже – інактивація) ферментів і нуклеїнових кислот та стабілізація багатьох низькомолекулярних метаболітів у кислому середовищі. Деяких речовин, які застосовуються для екстракції, в подальшому за необхідності можна легко позбутись. Так, іони ClO₄⁻ легко осаджуються при додаванні сполук калію (наприклад, K₂CO₃). Крім того, для екстракції можуть застосовуватись органічні розчинники – метанол, етанол, ацетон тощо.

Визначення вмісту низькомолекулярних метаболітів у екстракті

У деяких випадках концентрація досліджуваної речовини у екстракті може бути визначена спектрофотометрично, безпосередньо через вимірювання поглинання світла певної довжини хвилі. Проте, здебільшого попередньо проводять реакцію між речовиною, вміст якої визначається, та певним реагентом, що призводить до утворення забарвлених продуктів. У подальшому концентрація цих продуктів у пробі визначається спектрофотометрично. Такий підхід допомагає суттєво підвищити специфічність і чутливість визначення.

Крім спектрометрії, для визначення вмісту певної речовини можуть застосовуватись і інші варіанти спектрального аналізу, наприклад, спектрофлуорометрія. Для підвищення специфічності аналізу можуть також застосовуватись ферментні препарати, які взаємодіють із досліджуваною сполукою (див. нижче метод визначення вмісту відновленої форми вітаміну С), що значно підвищує специфічність аналізу.

Метаболіти як маркери фізіологічного стану рослин

Кожна рослина містить тисячі метаболітів, які належать до різних хімічних класів. Багато сполук (цукри, амінокислоти, нуклеотиди, ліпіди тощо) зустрічаються у всіх рослин. Вони є продуктами первинного метаболізму і необхідні для забезпечення основних життєво важливих функцій організму, таких як дихання, фотосинтез, детоксикація, транспорт речовин, тощо. Інші сполуки (алкоголіди, флавоноїди, глюкозиди тощо) є продуктами вторинного метаболізму. Ці сполуки не є абсолютно необхідними для виживання рослин і як правило пов'язані із більш специфічними процесами, як от привертання запилювачів, захист від хижаків та ін. Вторинні метаболіти часто характерні лише для певних видів рослин.

Вміст ряду метаболітів можна використовувати як характеристику фізіологічного стану рослин. До таких метаболітів зокрема належать аскорбат, глутатіон, каротиноїди, поліфенольні сполуки, пролін, хлорофіли тощо.

Вітамін С – водорозчинний вітамін, який міститься у багатьох фруктах і овочах, зокрема в цитрусових, полуниці, броколі та перці. Вітамін С представлений у клітині у двох формах: відновлений – аскорбат (Asc), та окислений – дегідроаскорбат (DHA). Аскорбат має багато важливих функцій. *Антиоксидантна функція та захист від стресу:* аскорбат – потужний антиоксидант, знешкоджує вільні радикали, які є високо активними молекулами, що пошкоджують клітини. Asc допомагає захистити клітини від окиснювального пошкодження при оксидативному стресі, який є наслідком надмірної генерації активних форм кисню (АФК – див. розд. Ферменти) за впливу водного дефіциту (посухи), низьких та високих температур, надмірного освітлення, ультрафіолетового випромінювання, засолення ґрунтів, високих концентрацій іонів важких металів та інших небезпечних факторів. Аскорбат взаємодіє з іншими антиоксидантами, такими як глутатіон та токоферолі, регулюючи окисно-відновні процеси в клітині. Аскорбат бере участь у синтезі фітогормонів, таких як етилен та абсцизова кислота. Ці гормони відіграють важливу роль у регуляції фізіологічних процесів росту та розвитку рослин.

Глутатіон. Існує у клітині у двох формах – відновлений та окислений. Відновлений глутатіон (GSH) – трипептид, який складається з залишків глутамінової кислоти, цистеїну та гліцину. Глутатіон - важливий антиоксидант, який захищає клітини від пошкодження вільними радикалами при оксидативному стресі. Інша важлива функція – участь у біотрансформації ксенобіотиків. Окислений глутатіон (GSSG) утворюється з двох молекул відновленого внаслідок відщеплення атомів водню та утворення ковалентного зв'язку між двома атомами сірки (-S-S-). У клітині GSSG може відновлюватись до GSH.

Каротиноїди – це група жовтих, оранжевих і червоних пігментів, які синтезуються рослинами. Містять у своїй структурі поліциклічні ізопренові ланцюги. Вони відіграють важливу роль у фотосинтезі, допомагаючи уловлювати кванти світла та передавати енергію до реакційного центру фотосистем. Виконують фотопротекторну роль, захищаючи фотосистеми від надмірного освітлення. Каротиноїди мають антиоксидантні властивості і можуть брати участь у захисті клітин від уражень ультрафіолетовим випромінюванням та вільними радикалами. Поділяються на дві групи. *Каротини* – група гідрофобних каротиноїдів, які не містять атомів кисню та мають загальну формулу $C_{40}H_x$. Найчастіше зустрічаються два стереоізмери – α - та β -каротини, молекули яких містять по два шестиатомних циклічних радикали, а також γ - та δ -каротини, які містять у молекулі один циклічний радикал. *Ксантофіли* – гідрофільні каротиноїди, які мають кислотні функціональні групи. До ксантофілів належать лютеїн, зеаксантин і віолаксантин.

Поліфенольні сполуки – це велика група органічних сполук, у структурі яких наявні два або більше фенольні кільця. Біосинтез всіх фенольних сполук пов'язані із шикіматним метаболічним шляхом. Поліфеноли широко поширені в природі. Вони зустрічаються в рослинах, грибах, бактеріях і навіть у деяких тварин. Деякі поліфеноли є низькомолекулярними сполуками, тоді як інші (напр., лігнін) є макромолекулами, оскільки їх молекулярна маса може сягати 800 Да. Поліфенольні сполуки підрозділяються на два класи -флавоноїди та нефлавоноїди.

Флавоноїди – це велика група природних сполук, які мають в своєму складі дві фенольні групи (C6), що з'єднані пропановою ланкою (C3). Загальна структурна формула флавоноїдів - C6–C3–C6. Флавоноїди поділяють на антоціани, флавони, флавоноли, флаванони, флаван-3-оли. Вони зустрічаються в багатьох рослинах у вигляді глікозидів, а також і в чистому вигляді. Найвідоміші у фітотерапії

флавоноїди: апігенін, гесперидин, гіперозид, кверцетин, кемпферол та рутин.

До *нефлавоноїдів* належать фенольні кислоти (ванілова, галова, гентизінова, кавова, корична, кумарова, ферулова та ін.), дубильні речовини (проціанідини, катехін, галлокатехін, елагова кислота та ін.), таніни, лігнани, стильбеноїди, антоціаніди (дельфінідин, пеларгонідин, пеонідин, ціанідин та ін.), антрахінони та кумарини.

У рослинах поліфенольні сполуки виконують різні функції. Вони є потужними антиоксидантами, які захищають клітини від пошкодження, оскільки здатні знешкоджувати вільні радикали, які утворюються у ланцюгових реакціях перекисного окислення ліпідів. Крім того, захисна функція поліфенолів визначається здатністю хелатувати іони важких металів. Також вони взаємодіють із багатьма ферментами та іншими біомолекулами, впливаючи на різні фізіологічні процеси в організмах тварин і людини. Тому поліфенольні сполуки вивчаються як потенційні корисні речовини у харчовій промисловості та медицині.

Пролін – це гетероциклічна амінокислота, яка є однією з двадцяти стандартних амінокислот, котрі необхідні для біосинтезу білків. Вільний пролін допомагає рослинам підтримувати тургор, захищає клітини від пошкодження і стимулює синтез антиоксидантів. Впливає на структуру та стабільність білків. Пролін може діяти як регулятор активності ферментів, зв'язуючись із ферментами та змінюючи їх конформацію, впливаючи на їх каталітичну ефективність та специфічність. Може реагувати з вільними радикалами та іншими окислювальними сполуками, нейтралізуючи їхні дії, тому виступає антиоксидантом, який захищає клітини від пошкоджень, спричинених АФК. Часто накопичується у великих кількостях за стресових умов, таких як посуха, низькі температури, сольовий стрес та інші. Вважається, що накопичення проліну зменшує пошкодження клітин і допомагає рослинам адаптуватися до стресу.

Тіобарбітурат активні продукти (ТБКАП) – сполуки, які утворюються внаслідок перекисного окислення ліпідів. Їх можна виявити з використанням тіобарбітурової кислоти як реагенту. Вміст ТБКАП використовується як маркер оксидативного стресу, спричиненого зростанням вмісту АФК у клітині.

Тіоли, або тіоловмісні сполуки – сполуки, які містять тіольні, або сульфгідрильні групи ($-SH$). Вони входять до складу багатьох біомолекул, зокрема амінокислот метіоніну та цистеїну, тіаміну (вітаміну B1), відновленого глутатіону, фітохелатинів (фракція низькомолекулярних, або небілкових тіолів) та білків (фракція високомолекулярних, або білкових тіолів). Тіольні групи мають чимало важливих функцій: *антиоксидантна функція* – захищають клітину від окислення за дії оксидативного стресу; *регуляція окисно-відновлювальних процесів* – у складі ферментів відіграють роль у багатьох біохімічних реакціях, включаючи процеси окисно-відновлювального метаболізму; *зв'язування та детоксикація токсичних металів*, наприклад, ртуті та кадмію, допомагаючи забезпечити захист клітин від їхньої шкідливої дії.

Хлорофіл – це зелений пігмент, який міститься в хлоропластах рослин. Він є основним пігментом, який бере участь у поглинанні світла в процесі фотосинтезу. Молекула хлорофілу складається з розташованого на поверхні тилакоїдної мембрани тетрапірольного хлороинового кільця, у центрі якого знаходиться атом магнію, та гідрофобного фітольного ланцюга («хвоста»), який занурений у ліпідну мембрану. Крім участі у фотосинтезі, хлорофіл також відіграє важливу роль у захисті рослин. Він поглинає ультрафіолетове світло, яке може пошкодити клітини. У більшості рослин зустрічаються два типи хлорофілу: хлорофіл а і хлорофіл b. Хлорофіл а є основним пігментом, який бере участь у фотосинтезі. Хлорофіл b є додатковим пігментом, який допомагає хлорофілу а поглинати світло у синьому і червоному

діапазонах спектра. Крім того, у багатьох водоростей знайдено хлорофіли c1 та c2 (у яких відсутній фітольний «хвіст»), а у ціанобактерій – хлорофіли d та f.

Робота 9. Вимірювання вмісту вітаміну С у рослинах

Мета: оволодіти методикою визначення вмісту відновленої та окисленої форм вітаміну С у листках рослин.

Обладнання та реактиви: ступки з товчачиками, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, спектрофотометр, кювети кварцові для спектрофотометра, промивалка, фільтрувальний папір, 2 М перхлоратна кислота (HClO_4), 1,25 М K_2CO_3 , 100 мМ калій-фосфатний буфер ($\text{pH}=5,8$), 30 мМ дитіотрейтол (DTT), розчин аскорбатоксидази (АОХ).

Примітка. Відновлена форма вітаміну С (аскорбат, Asc) на відміну від окисленої форми (дегідроаскорбату, DHA) має максимум поглинання світла при довжині хвилі 265 нм. Ця особливість може бути використана для визначення концентрації вітаміну С. Проте, слід брати до уваги, що у рослинних тканинах присутні багато інших сполук (нуклеотиди, поліфеноли, тощо), які також поглинають світло із довжиною хвилі 265 нм, що заважає правильному вимірюванню. Тому для забезпечення коректного визначення вмісту аскорбату у наведеній нижче методиці пробу обробляють аскорбатоксидазою, яка специфічно розщеплює аскорбат, що супроводжується зниженням поглинання світла із довжиною хвилі 265 нм. Аналогічно, для визначення вмісту дегідроскарбату пробу обробляють дитіотрейтолом, що призводить до відновлення DHA до Asc, а отже - зростанням поглинання світла із довжиною хвилі 265 нм. Зміни оптичної густини проб вимірюють на спектрофотометрі і використовують у розрахунках.

Хід роботи

1. Помістіть у фарфорову ступку 150 мг рослинного матеріалу і розітріть у рідкому азоті до однорідної маси, НЕ ДОПУСКАЮЧИ РОЗМОРОЖУВАННЯ.

2. Додайте 300 мкл 2 М HClO_4 та кількісно перенесіть гомогенізований рослинний матеріал у мікроцентрифужну пробірку.

3. Перемішайте та відцентрифугуйте проби протягом 15 хв за 15000 g.

4. Відберіть супернатант у чисті мікроцентрифужні пробірки та додайте до нього по краплинах 210 мкл 1,25 М K_2CO_3 .

5. Паралельно приготуйте холосту пробу. Для цього змішайте 300 мкл 2М HClO_4 та 210 мкл 1,25 М K_2CO_3 .

6. Відцентрифугуйте дослідну та холосту проби (пп. 4 та 5) протягом 10 хв за 15000 g.

7. Відберіть супернатант у чисті мікроцентрифужні пробірки та зберігайте за температури 0 °С для подальших досліджень.

8. Визначте вміст окисленої форми вітаміну С (дегідроаскорбату) – проба «ДНА»:

- у дослідну кювету додайте 910 мкл 100 мМ калій фосфатного буфера та 50 мкл рослинного екстракту;

- у контрольну кювету внесіть 910 мкл 100 мМ калій-фосфатного буфера та 50 мкл холостої проби.

9. Виміряйте оптичну густину дослідної проби «ДНА» проти контрольної на спектрофотометрі за довжини хвилі 265 нм.

10. Дослідну та контрольну проби перенесіть у чисті мікроцентрифужні пробірки, додайте по 40 мкл 30 мМ DTT, перемішайте, щільно закрийте та інкубуйте у темряві при 25 °С протягом 1,5 години.

11. Виміряйте оптичну густину дослідної проби «ДНА» проти контрольної на спектрофотометрі за довжини хвилі 265 нм.

12. Визначте вміст відновленої форми вітаміну С (аскорбату) – проба «Asc»:

- у дослідну кювету «Asc» внесіть 940 мкл 100 мМ калій фосфатного буфера та 50 мкл рослинного екстракту;

- у контрольну кювету внесіть 950 мкл 100 мМ калій фосфатного буфера та 50 мкл холостої проби.

13. Виміряйте оптичну густину дослідної проби «Asc» проти контрольної на спектрофотометрі за довжини хвилі 265 нм.

14. Додайте до дослідної проби «Asc» 10 мкл АОХ (1 одиниця активності), швидко перемішайте та виміряйте оптичну густину через 10 секунд, 1, 2 та 3 хв.

10. Розрахуйте зміни оптичної густини проб «Asc» та «ДНА», які відбулися протягом досліду. Використайте отримані значення для визначення вмісту відновленої та окисленої форм вітаміну С у пробі (у мкмоль на 1 кг сирої маси наважки), застосовуючи при розрахунках коефіцієнт екстинкції K_{ex} , який складає $12 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Робота 10. Кількісне визначення фотосинтетичних пігментів

Мета: вивчити вміст пігментів у рослин різних світлових екотипів.

Обладнання та реактиви: ступки, ножиці, мірні пробірки, паперовий фільтр, лійки, хімічні склянки, 80 %-й ацетон, оксид магнію, спектрофотометр.

Хід роботи

1. 100 мг рослинного матеріалу помістіть у ступку, додайте 100 мг MgO або MgCO₃ (для запобігання феофітінзації), заморозьте у рідкому азоті та гомогенізуйте.

2. Долийте 3 мл 100 %-го ацетону та перемішайте. Отриманий гомогенат кількісно перенесіть у мірну пробірку на 10 мл.

3. Двічі промийте ступку, додаючи по 3 мл ацетону. Промивну рідину перенесіть у пробірку з гомогенатом.

4. Доведіть загальний об'єм гомогенату ацетоном до 10 мл. *Робота кількісна, не можна втрачати жодної краплі!*

5. Відцентрифугуйте при 13 000 g протягом 5 хв.

6. Перенесіть супернатант у чисту пробірку. Отриманий супернатант містить суму зелених і жовтих пігментів.

7. Концентрацію хлорофілу *a* і *b* визначте на спектрофотометрі. Для цього частину отриманого екстракту налейте у кювету. Як контроль у другу кювету налейте 100 %-й ацетон.

8. Кювети помістіть до кюветної камери спектрофотометра і визначте оптичну густину (OD) екстракту при довжинах хвиль, що відповідають максимумам поглинання хлорофілу *a* і *b* у даному розчиннику. Для хлорофілу *a* у 100 %-му ацетоні максимум поглинання в червоній ділянці спектра спостерігається при $\lambda = 661,6$ нм, для хлорофілу *b* – при $\lambda = 644,8$ нм. Каротиноїди визначте при $\lambda = 470$ нм.

9. Концентрації пігментів розрахуйте за формулами

$$C_a \text{ (мг/мл)} = 11,24 \cdot OD_{661,6} - 2,04 \cdot OD_{644,8};$$

$$C_b \text{ (мг/мл)} = 20,13 \cdot OD_{644,8} - 4,19 \cdot OD_{661,6},$$

де C_a і C_b – концентрації хлорофілу *a* і *b* в мг/мл;

OD – оптична густина.

Концентрацію каротиноїдів (мг/мл) у сумарній витяжці пігментів обчисліть за формулою:

$$C_{\text{кар.}} = (1000 \cdot OD_{470} - 1,90 C_a - 63,14 C_b) / 214,$$

де C_a та C_b – вміст хлорофілів a і b у розчині (мг/мл).

10. Встановивши концентрацію пігментів у витяжці (мг/л), визначіть їх вміст у досліджуваному матеріалі з урахуванням об'єму екстракту і наважки проби:

$$C = v \cdot c / m \cdot 1000,$$

де c – концентрація пігментів у мг/мл;

v – об'єм екстракту в мл (10 мл);

m – наважка рослинного матеріалу в г (0,1 г);

C – вміст пігментів у рослинному матеріалі в мг/г сирової маси.

Робота 11. Визначення вмісту поліфенольних сполук

Мета: оволодіти методом вимірювання вмісту поліфенольних сполук у листках рослин.

Обладнання та реактиви: ступки з товкачиками, електронні ваги, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, скляні мірні пробірки, термостат, фільтрувальний папір, спектрофотометр, кювети кварцові, промивалка, 10%-й розчин карбонату натрію (Na_2CO_3), екстракційна суміш (1%-й розчин HCl у 96%-му етанолі), 10%-й розчин реактиву Фоліна-Чокальтеу (стандартний розчин, розведений водою у співвідношенні 1 до 10), свіжоприготовлені розчини галової кислоти з концентраціями 20 мкг/мл (GA 20) та 100 мкг/мл (GA 100).

Хід роботи

1. Помістіть у фарфорову ступку 200 мг рослинного матеріалу, залийте рідким азотом та гомогенізуйте з допомогою товкачика, НЕ ДОПУСКАЮЧИ РОЗМОРОЖУВАННЯ.

2. Додайте до проби 600 мкл підігрітої до 45 °С екстракційної суміші, перемішайте та кількісно перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку.

3. Інкубуйте протягом 15 хв при 45 °С.

4. Центрифугуйте 10–15 хв при 13 000 g.

5. Перенесіть супернатант у чисті пробірки об'ємом на 2 мл.

6. Додайте до осаду 600 мкл підігрітої до 45 °С екстракційної суміші та перемішайте. Інкубуйте протягом 5 хв при 45 °С.

7. Відцентрифугуйте 10–15 хв 13 000 g.

8. Відберіть супернатант, об'єднайте його із супернатантом з пункту 5 та виміряйте загальний об'єм.

9. Внесіть у дві пробірки (дослідна та контрольна) по 1,9 мл води та 400 мкл 10%-го розчину реактиву Фоліна-Чокальтеу.

10. У дослідну пробірку додайте 100 мкл екстракту (пункт 8).

11. У контрольну пробірку додайте 100 мкл екстракційного буфера.

12. В обидві пробірки додайте по 800 мкл 10 %-го Na_2CO_3 та швидко перемішайте.

13. Через 10 секунд виміряйте оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 765 нм для дослідної проби, виставивши її проти контрольної.

14. Перенесіть вміст кювет назад у пробірки, оберніть їх фольгою та помістіть у темне місце на 1 годину при кімнатній температурі (20–22°C).

15. Повторно виміряйте оптичну густину зразків на спектрофотометрі.

16. Вирахуйте вміст поліфенольних сполук у пробі за калібрувальним графіком, побудованим для галової кислоти.

17. Перерахуйте вміст поліфенольних сполук на 1 г сирови ваги рослинного матеріалу з урахуванням розведень.

Побудова калібрувального графіка

1. Пронумеруйте 10 пробірок та налейте у кожен по 1,9 мл води, 400 мкл 10%-го розчину реактиву Фоліна-Чокальтеу та 100 мкл екстракційного буфера, перемішайте.

2. Додайте у кожен пробірку розчин галової кислоти згідно з таблицею (УВАГА! Додавайте не у всі пробірки одразу, а партіями по 5–6 пробірок).

3. Додайте до кожної пробірки необхідний об'єм 10%-го Na_2CO_3 (див. таблицю).

4. Виміряйте оптичну густину кожної пробірки на спектрофотометрі за довжини хвилі 765 нм через 10 секунд та 1 годину (див. пп. 13-15).

5. За отриманими результатами побудуйте калібрувальний графік.

№ п/п	Концентрація ГА, мкг / пробу	Стоковий розчин ГА, мкл	10%-й Na_2CO_3 , мкл
1	0,4	20 (ГА 20)	780
2	0,8	40 (ГА 20)	760
3	1,2	60 (ГА 20)	740
4	1,6	80 (ГА 20)	720
5	2,0	100 (ГА 20)	700
6	2,0	20 (ГА 100)	780
7	3,0	30 (ГА 100)	770
8	4,0	40 (ГА 100)	760
9	5,0	50 (ГА 100)	750
10	6,0	60 (ГА 100)	740
11	8,0	80 (ГА 100)	720
12	10,0	100 (ГА 100)	700

Робота 12. Визначення вмісту флавоноїдів

Мета: оволодіти методом вимірювання загального вмісту флавоноїдів у рослинному матеріалі.

Обладнання та реактиви: ступки з товкачиками, електронні ваги, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, скляні мірні пробірки, термостат, фільтрувальний папір, спектрофотометр, кювети кварцові, промивалка, 1М натрій-ацетатний буфер (pH=4,3), 10%-й розчин хлориду алюмінію (AlCl_3), екстракційний розчин (1% розчин HCl у 96%-му етанолі), розчин кверцетину з концентрацією 50 мкг/мл.

Хід роботи

1. Помістіть у фарфорову ступку 200 мг рослинного матеріалу, залийте рідким азотом та гомогенізуйте з допомогою товкачика, НЕ ДОПУСКАЮЧИ РОЗМОРОЖУВАННЯ.

2. Додайте до проби 600 мкл підігрітої до 45 °C екстракційної суміші, перемішайте та кількісно перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку.

3. Інкубуйте протягом 15 хв при 45 °C.

4. Центрифугуйте 10-15 хв при 13 000 g.

5. Перенесіть супернатант у чисту мікроцентрифужну пробірку об'ємом на 2 мл.

6. Додайте до осаду 600 мкл підігрітої до 45 °C екстракційної суміші та перемішайте. Інкубуйте протягом 5 хв при 45 °C.

7. Відцентрифугуйте 10–15 хв 13 000 g.

8. Об'єднайте отриманий супернатант із супернатантом з пункту 5. Виміряйте його сумарний об'єм.

9. Внесіть у дві пробірки (дослідна та контрольна) по 4,7 мл води, 100 мкл 10%-го розчину AlCl_3 та 100 мкл 1М натрій-ацетатного буферу (pH=4,3).

10. У дослідну пробірку додайте 100 мкл екстракту (пункт 8).

11. У контрольну пробірку додайте 100 мкл екстракційного буфера.

12. Ретельно перемішайте та через 10 секунд виміряйте оптичну густину дослідної проби проти контрольної на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм.

13. Перенесіть вміст кювет назад у пробірки, оберніть їх фольгою та інкубуйте у темному місці 30 хв при кімнатній температурі (20–22°C).

14. Повторно виміряйте оптичну густину зразків на спектрофотометрі.

15. Вирахуйте вміст флавоноїдів у пробі за калібрувальним графіком, побудованим для кверцетину.

16. Перерахуйте вміст флавоноїдів на 1 г сирови ваги рослинного матеріалу з урахуванням розведень.

Робота 13. Визначення вмісту вільного проліну

Мета: оволодіти методикою вимірювання вмісту вільного проліну у рослинному матеріалі.

Обладнання та реактиви: ступки з товкачиками, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, термостат, спектрофотометр, кювети кварцові, промивалка, фільтрувальний папір, лід, толуол, сульфосаліцилова кислота, льодяна оцтова кислота, нінгідрин.

Хід роботи

1. Приготуйте необхідні для роботи розчини

- 3%-на сульфосаліцилова кислота (SSA): змішайте 97 мл дистильованої води та 3 г сульфосаліцилової кислоти; поставте на магнітну мішалку та доведіть до повного розчинення. Зберігайте в холодильнику.

- *кисла нінгідрінова суміш* (УВАГА! ПРАЦЮВАТИ ПІД ВИТЯЖНОЮ ШАФОЮ): змішайте 1,25 г нінгідрину та 30 мл льодяної оцтової кислоти, нагрійте на водяній бані до повного розчинення нінгідрину; охолодіть і додайте 20 мл 6 М ортофосфорної кислоти. Реактив придатний до використання протягом 24 годин. Зберігайте в холодильнику.

- *6 М ортофосфорна кислота*: змішайте 41,2 мл 85 % (14,6 М) ортофосфорної кислоти та 24 мл дистильованої води, перемішайте та доведіть об'єм дистильованою водою до 100 мл. Зберігайте в холодильнику.

2. Розітріть у фарфоровій ступці з рідким азотом 150мг рослинного матеріалу, НЕ ДОПУСКАЮЧИ РОЗМОРОЖУВАННЯ.

3. Додайте 800 мкл 3 % SSA, розмішайте пробу та перенесіть гомогенат у чисту центрифужну пробірку.

4. Відцентрифугуйте протягом 5 хв при 3000 g.

5. Відберіть супернатант та доведіть його об'єм до 1 мл, додаючи 3 % SSA.

6. Додайте у кожну пробу по 1 мл льодяної оцтової кислоти та 1 мл кислої нінгідрінової суміші.

7. Добре перемішайте та проінкубуйте 1 годину на водяній бані за температури 96 °C.

8. Охолодіть на льоду.

9. Додайте по 2 мл толуолу та перемішайте на вортексі.

10. Відцентрифугуйте 10 хв при 3000 g і відберіть верхню (забарвлену) фазу.

11. Виміряйте оптичну густину (OD) отриманих проб на спектрофотометрі за довжини хвилі 520 нм. Для контролю використовуйте толуол.

12. За допомогою калібрувального графіка визначте концентрацію проліну у пробах та розрахуйте вміст проліну у рослинному матеріалі (у мкмоль на кг сирої маси).

Робота 14. Визначення вмісту тіобарбітурат-активних продуктів (ТБКАП)

Мета: оволодіти методом визначення вмісту ТБКАП у листках досліджуваних рослин.

Обладнання та реактиви: фарфорові ступки з товчачиками, електронні ваги, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, мірні скляні пробірки, водяна баня (96 °С), спектрофотометр, кювети кварцові для спектрофотометра, промивалка, фільтрувальний папір, 96 %-й ацетон; вода дистильована; 0,5 % тіобарбітурова кислота (ТБК) у 20 % ТХО.

Хід роботи

1. Помістіть у фарфорову ступку 150 мг рослинного матеріалу, залийте рідким азотом і розітріть до однорідної маси, НЕ ДОПУСКАЮЧИ РОЗМОРОЖУВАННЯ.

2. Додайте 650 мкл 96 %-го ацетону та кількісно перенесіть у мікроцентрифужну пробірку.

3. Ретельно перемішайте та проінкубуйте 5 хв за кімнатної температури (20 °С).

4. Відцентрифугуйте при 15000 g протягом 10 хв.

5. Перенесіть отриманий супернатант у чисту скляну центрифужну пробірку і доведіть об'єм до 1 мл 96%-м ацетоном.

7. Додайте до кожної з досліджуваних проб по 0,5 мл дистильованої води та 1,5 мл 0,5% ТБК в 20% ТХО.

8. Паралельно приготуйте холосту контрольну пробу, яка містить 1 мл 96 %-го ацетону, 0,5 мл дистильованої води та 1,5 мл 0,5 % ТБК в 20% ТХО.

9. Добре перемішайте проби, закрийте корками та проінкубуйте на водяній бані при 96 °С протягом 40 хв.

10. Після закінчення часу інкубації всі проби доведіть 96 % ацетоном до об'єму 3 мл та проінкубуйте за температури 0 °C протягом 10 хв.

11. Відцентрифугуйте проби при 3000 g протягом 10 хв.

12. Перенесіть отриману надосадову рідину у чисті пробірки.

13. Виміряйте оптичну густину (OD) отриманих проб на спектрофотометрі за довжин хвиль 440, 532 та 600 нм.

14. Розрахуйте вміст ТБКАП у пробі, використовуючи формулу

$$C = ((OD_{532} - OD_{600}) - 0,057 (OD_{440} - OD_{600})) \times 6370 \times L^{-1} \times V_{\text{пр.}}^{-1} \times M^{-1},$$

де С – вміст ТБКАП у пробі (у мкмоль на 1 кг сирової маси наважки),

OD – оптична густина розчину в кюветі за відповідної довжини хвилі,

$V_{\text{пр.}}$ – остаточний об'єм проби, 3 мл,

L – довжина оптичного шляху (товщина кювети), см

M – сира маса проби, мг.

Примітка. Наведена методика розроблена у роботі Du and Bramlage (1992) і дає змогу визначати вміст ТБКАП у рослинному матеріалі, який може містити високі концентрації сахарози.

Робота 15. Визначення вмісту тіольних груп

Мета: визначити концентрацію SH-груп у білкових та небілкових фракціях рослинного екстракту.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, секундомір, ступки та товкачки, стакани, мікроцентрифужні пробірки типу

«Епендорф», набір автоматичних дозаторів та наконечники до них, кварцові кювети, рідкий азот, лід, екстракційний буфер (0,2 М трис-НСІ (рН 7,4); 0,02 М ЕДТА), 0,2 мМ трис-НСІ (рН 8,2), 0,01 М 5,5'-дітіобис-(2-нітробензойна кислота) (ДТНБ), 0,5 % розчин ДДС-Na.

Хід роботи

1. 200 мг замороженого рідким азотом рослинного матеріалу швидко гомогенізуйте та залийте 1 мл екстракційного буфера.

2. Перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку та відцентрифугуйте 10 хв при 15 000 g та 4 °С.

3. Обережно, не торкаючись осаду, перенесіть супернатант у чисту мікропробірку.

Визначення загального вмісту тіольних груп

4. Приготуйте дослідну пробу. Для цього у чистій пробірці змішайте 100 мкл супернатанту, 300 мкл 0,2 мМ трис-НСІ (рН 8,2), 20 мкл 0,01 М ДТНБ та 1580 мкл 0,5 % ДДС-Na.

5. Паралельно приготуйте контрольну пробу. Для цього змішайте 100 мкл 0,2 М трис-НСІ (рН 7,4), 300 мкл 0,2 мМ трис-НСІ (рН 8,2), 20 мкл 0,01 М ДТНБ та 1580 мкл 0,5 % ДДС-Na.

6. Інкубуйте пробірку з дослідним зразком при кімнатній температурі (20 °С) протягом 30 хв.

7. Центрифугуйте пробу при 10 000 g протягом 10 хв.

8. Виміряйте інтенсивність жовтого забарвлення, яке виникає у дослідній пробі в процесі реакції на спектрофотометрі при довжині хвилі 415 нм проти контрольної проби.

9. Розрахуйте загальний вміст тіольних груп (мкмоль на 1 грам білка), використовуючи коефіцієнт екстинкції 13600 мМ см⁻¹.

Визначення вмісту небілкових тіольних груп

10. Для отримання фракції небілкових (розчинних) тіольних груп осадіть білки, які присутні у пробі. Для цього змішайте 0,5 мл супернатанту (п. 3) з 0,4 мл дистильованої води і 0,1 мл 50%-ої трихлороцтової кислоти.

11. Інкубуйте протягом 15 хв та центрифугуйте при 10 000 g протягом 15 хв. Перенесіть супернатант у чисту пробірку.

12. Концентрацію небілкових тіольних груп виміряйте аналогічно, як описано для визначення загального вмісту тіольних груп (пп. 4–8).

13. Розрахуйте вміст білкових тіольних груп відніманням вмісту небілкових груп від загального вмісту тіолів.

Робота 16. Визначення внутрішньоклітинного вмісту активних форм кисню у суспензійній культурі *Arabidopsis thaliana* за дії теплового стресу

Мета: виміряти відносний вміст активних форм кисню (АФК) *in vivo* у суспензії клітин мезофілу за впливу теплового стресу.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, флуорометр, секундомір, ступки та товкачики, стакани, мікроцентрифужні пробірки типу «Епендорф», набір автоматичних дозаторів та наконечники до них, кварцові кювети, рідкий азот, лід, суспензійна культура клітин мезофілу *Arabidopsis thaliana*, 0,5 мМ розчин карбокси-HDCFDA (5–6-карбокси-2',7'-діхлородигідрофлуоресцеїн діацетат), 0,5 М ЕДТА, екстракційний буфер (0,2 М трис-НCl (pH 7,4); 0,02 М ЕДТА), 0,2 мМ трис-НCl (pH 8,2).

Хід роботи

1. Помістіть під ламінар-бокс стерильні пробірки, піпетки та носики з фільтром та колби зі суспензійною культурою клітин *Arabidopsis thaliana*, які знаходяться в експоненціальній фазі росту.

2. Відберіть у дві стерильні пробірки по 5 мл суспензійної культури, додайте по 100 мкл 0,5 мМ карбокси-HDCFDA та інкубуйте протягом 5 хв при 20 °C для попереднього завантаження клітин флуоресцентним зондом.

Примітка. Важливо, щоб у кожную пробу було відібрано однакову кількість клітин арабідопсису. Оскільки клітини у культурі швидко осідають на дно, колбу треба обережно струшувати перед відбором кожної порції клітин.

3. Перенесіть пробірки на качалки (60 рухів за хв). Інкубуйте одну з пробірок за 22 °C (контроль), а іншу за 37 °C (дослід) у темряві протягом однієї години.

4. Перенесіть зразки на лід та додайте по 5 мкл 0,5 М ЕДТА та перемішайте.

5. Зруйнуйте клітини ультразвуковою обробкою (1 хв, 30 Вт) за допомогою соніфікатора.

6. Виміряйте флуоресценцію в кожній пробірці за допомогою флуоресцентного спектрофотометра F2000 (Hitachi) при довжинах хвиль збудження та випромінювання 503 та 525 нм, відповідно.

7. Для кожного зразка експеримент необхідно проводити для трьох проб паралельно.

8. Розрахуйте відносний вміст АФК у дослідній пробі, беручи їх вміст у контролі за 100 %.

Запитання та завдання для самоконтролю

1. Які речовини відносять до низькомолекулярних метаболітів.
2. Які буферні розчини використовують для екстракції низькомолекулярних метаболітів?
3. В чому полягає суть методу визначення вмісту поліфенолів?
4. Які Ви знаєте методи визначення вмісту метаболітів?
5. Охарактеризуйте основні форми вітаміну С в рослинній клітині. В чому полягає принцип їх визначення?
6. Розкрийте механізми розвитку процесів ПОЛ у клітині.
7. ТБКАП як маркери оксидативного стресу в клітині.
8. У чому полягає суть методу визначення карбонільних груп білків?
9. Яку роль відіграє амінокислота пролін у рослин?
10. Які активні форми кисню Вам відомі?
11. Яку роль відіграє пероксид водню у рослинній клітині під час стресу?

БІЛКИ: ЗАГАЛЬНІ ПІДХОДИ

Білки виконують численні функції у клітині. Білки-ферменти є біологічними каталізаторами і являють собою основні «молекулярні інструменти», які забезпечують контроль метаболічного життя клітини. Інші групи білків, такі як білки-рецептори, протеїнкази, транскрипційні фактори, гістонові та негістонові білки хроматину безпосередньо забезпечують регуляцію експресії генів. Крім того, білки – важливі структурні елементи клітини. Зрозуміло, що різноманіття функцій робить білки об'єктом уваги сучасної біохімії та молекулярної біології.

Виділення білків

Білки – це біополімери, які складаються з 20 амінокислот, суттєво різних за своїми хімічними характеристиками. Завдяки цьому білкам притаманна висока гетерогенність за фізико-хімічними властивостями. Зокрема, білки можуть мати різні розміри та форму, різні ізоелектричні точки, різну розчинність у буферах тощо. Тому немає єдиного загального рецепта для виділення всіх білків. На сьогодні запропоновано багато методик виділення, які, залежно від мети експерименту, дають можливість отримувати білки в нативному або денатурованому вигляді.

Робота 17. Виділення загального білка в присутності сечовини

Мета: ознайомитися з методом виділення білка в денатуруючих умовах.

Обладнання та реактиви: холодильна камера, вага, ступки зі товкачиком для розтирання, настільна центрифуга, мікроцентрифужні пробірки, автоматичні мікропіпетки з наконечниками, стакани, колби, мірні пробірки, шпателі, лід, рідкий азот, кристалічна сечовина, бідистильована вода, 1 М трис-НСІ (рН 8,0), β-меркаптоетанол, рослинний матеріал.

Хід роботи

1. Приготуйте буфер для виділення білка, який містить 8 М сечовину, 50 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 20 мМ β-меркаптоетанол.

2. Налийте в ступку рідкий азот і заморозьте 0,5 г рослинного матеріалу. Швидко розітріть наважку та додайте 500 мкл буфера для виділення.

3. Перенесіть гомогенат за допомогою автоматичної мікропіпетки з підрізаним носиком у чисту мікроцентрифужну пробірку та залиште інкубуватися при кімнатній температурі протягом 15 хв.

4. Відцентрифугуйте проби 15 хв при 15 000 g (13000 об/хв, центрифуга Biofuge pico).

5. За допомогою мікропіпетки обережно відберіть водну фазу в чисту мікропробірку, не торкаючись носиком осаду.

6. Білковий екстракт залежно від подальшої мети використовуйте безпосередньо для експериментів або зберігайте при мінус 20 °С або мінус 70 °С. (Перед використанням у подальших експериментах необхідно визначити кількість білка в екстракті – див. роботу 18).

Кількісне визначення вмісту білка

Кількість білка у пробі визначають різними методами. Концентрацію очищеного білка в буферному розчині можна виміряти за поглинанням світла в ультрафіолетовій області спектра (див. «Спектрометричний аналіз», робота 7). Проте цей метод малопридатний, якщо в розчині наявні інші речовини, оскільки вони можуть також поглинати частину світла в цьому спектральному діапазоні, тобто впливати на результати вимірювання. Ця проблема особливо актуальна при отриманні білкових екстрактів із рослинних об'єктів, які містять значну кількість алкалоїдів, флавоноїдів та інших

вторинних сполук. Тому в таких випадках для визначення концентрації білка застосовують методи, які ґрунтуються на вимірюванні інтенсивності забарвлення, виниклого внаслідок взаємодії білка з певним реагентом. Широко розповсюджені методи Лоурі, Бредфорда та використання біуретового реактиву, з яких найзручніший і швидкий метод Бредфорда.

Метод Бредфорда базується на визначенні кількості барвника кумасі діамантового блакитного G-250, яка зв'язується з молекулами білка, що призводить до зміни спектра поглинання барвника. Метод Бредфорда дає змогу визначати від 1 до 10 мкг білка у пробі.

Метод Лоурі оснований на колориметричному визначенні інтенсивності синього забарвлення, яке утворюється при взаємодії реактиву Фоліна із залишками тирозину в молекулі білка. Відповідно, він непридатний для коректного визначення концентрації білка, який містить невелику кількість цієї амінокислоти. Метод Лоурі дозволяє визначати від 1 до 20 мкг білка у пробі.

Біуретовий метод ґрунтується на вимірюванні поглинання світла речовиною синього забарвлення, що з'являється при взаємодії пептидних зв'язків молекули білка з іонами міді в лужному середовищі. Чутливість біуретового методу приблизно в сто разів нижча за методи Бредфорда та Лоурі.

Робота 18. Визначення загального вмісту білка

Мета: ознайомитися з методами визначення кількості протеїнів у розчині.

Обладнання та реактиви: вага, ФЕК, спектрофотометр, склянки, колби, мірні пробірки, шпателі, скляні піпетки, груші або дозатори, міліметровий папір, фільтрувальний папір, сухі карбонат натрію, сульфат міді, тартрат натрію дигідрат, кумасі діамантовий блакитний G-250, бичачий

альбумін, бідистильована вода, 0,15 М NaCl, 0,15 %-й дезоксихолат натрію, 72 % ТХО, біуретовий реактив, реактив Фоліна, фосфорна кислота, етанол, розчин білка невідомої концентрації.

Хід роботи

А. Визначення кількості білка у пробі за методом Бредфорда

1. Приготуйте розчин реактиву Бредфорда. Для цього розчиніть 100 мг кумасі діамантового блакитного G-250 у 50 мл 95 %-го етанолу. Додайте 100 мл 85 %-ої фосфорної кислоти. Доведіть об'єм бідистильованою водою до 1 л. Профільтруйте через паперовий фільтр. Зберігайте у холодильнику (4 °C).

2. Приготуйте 1 мл розчину альбуміну з концентрацією 0,5 мг/мл.

3. Приготуйте три комплекти з 10 мікроцентрифужних пробірок, у які налейте по 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 та 40 мкл розчину альбуміну та доведіть об'єм проб до 200 мкл 0,15 М розчином NaCl (ці проби використовуються для побудови калібрувального графіка). В одну пробірку налейте 100 мкл 0,15 М NaCl (контрольна проба). У три пробірки внесіть по 5–20 мкл розчину білка невідомої концентрації та доведіть об'єм цих проб до 200 мкл додаванням 0,15 М NaCl (експериментальні проби).

4. Додайте до кожної проби по 1,8 мл реактиву Бредфорда. Добре перемішайте та інкубуйте 2–5 хв при кімнатній температурі.

5. Перенесіть проби в кювети та визначте показники оптичної густини на спектрофотометрі при довжині хвилі 595 нм. За отриманими даними побудуйте калібрувальну криву.

6. За калібрувальною кривою визначте кількість білка в невідомій пробі.

Примітка: Наявність у пробі таких речовин, як гліцерол, трис, β-меркаптоетанол, детергенти, оцтова кислота, сульфат амонію тощо впливають на розвиток забарвлення. У такому разі необхідно побудувати калібрувальну криву, додавши в калібрувальні проби відповідні речовини.

Б. Визначення кількості білка у пробі за методом Лоурі

1. Приготуйте необхідні для роботи розчини:

- 1 мл калібрувального розчину бичачого альбуміну з концентрацією 0,5 мг/мл;
- 10 мл 20 %-го реактиву Фоліна;
- 50 мл розчину, який містить 0,2 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ та 0,2 % $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$;
- 50 мл 20 % Na_2CO_3 ;
- 100 мл маточного розчину СТС (СТС – *coper tartrate/carbonate solution*). Його отримують, змішуючи два останні розчини у співвідношенні 1:1. Цей розчин залишається стабільним протягом 8 тижнів при кімнатній температурі;
- 20 мл СТС робочого розчину, змішуючи по 5 мл маточного розчину СТС, 0,8 М NaOH, 10 % ДДС-Na та бідистильованої води. Цей розчин стабільний при кімнатній температурі протягом 1–2 тижнів.

2. Налийте в подвійний набір мікропробірок по 50, 100, 150 та 200 мкл калібрувального розчину альбуміну. У дві пробірки налейте по 100 мкл розчину білка невідомої концентрації. Доведіть об'єм кожної пробірки бідистильованою водою до 1 мл. У дві чисті пробірки налейте по 1 мл води (контроль).

3. Додайте по 100 мкл 0,15 %-го дезоксихолату натрію та перемішайте. Залишіть при кімнатній температурі протягом 10 хв.

4. Додайте по 100 мкл 72 % ТХО та перемішайте.

5. Відцентрифугуйте 15 хв при 3 000 г (6 000 об/хв, центрифуга Biofuge pico).

6. Злийте супернатант і розчиніть осад у 1 мл бідистильованої води.

7. Додайте 1 мл СТС робочого розчину, перемішайте та залиште при кімнатній температурі на 10 хв.

8. Додайте 500 мкл 20 %-го реактиву Фоліна, одразу перемішайте та залишіть при кімнатній температурі на 30 хв.

9. Виміряйте інтенсивність забарвлення на ФЕК при довжині хвилі 750 нм.

10. Побудуйте калібрувальний графік і визначте за ним концентрацію білка в невідомому розчині.

Примітка: Наявність у пробі багатьох речовин, зокрема органічних буферів, тіолів і детергентів, впливає на розвиток забарвлення при застосуванні методу Лоурі. У такому разі необхідно побудувати калібрувальну криву, додавши у проби відповідні речовини. Метод Лоурі малопридатний для визначення вмісту білків у екстрактах рослинних тканин, які містять багато фенольних сполук, оскільки ці сполуки реагують з реактивом Фоліна. Переосадження білка ТХО допомагає позбутися багатьох речовин, які впливають на розвиток забарвлення та дає можливість коректно визначити кількість багатьох білків.

В. Визначення кількості білка у пробі за допомогою біуретового реактиву

1. Для побудови калібрувальної кривої приготуйте ряд розведених розчинів із калібрувального розчину білка. Для цього в пробірки додають 0,4; 0,6; 0,8 та 1 мл розчину та доводять водою до 1 мл.

2. Із кожного розведення та з розчину невідомої концентрації відберіть у пробірки по 40 мкл та додайте по 2 мл біуретового реактиву.

3. Перемішайте та витримайте при кімнатній температурі 30 хв.

4. Виміряйте показники оптичної густини проб на ФЕК при довжині хвилі 540 нм, побудуйте калібрувальну криву та визначте концентрацію білка в експериментальній пробі.

Карбонільні групи у складі білків

Карбонільна група – це хімічна група, яка містить подвійний зв'язок між атомом вуглецю і атомом кисню ($C=O$). Карбонільні групи - альдегіди ($-CH=O$) та кетони ($>C=O$) - виникають у молекулах білків як результат взаємодії бічних радикалів амінокислотних залишків, в першу чергу – аргініну, лізину, проліну та треоніну, з АФК. Відповідно, вимірювання вмісту карбонільних груп у білках слугує маркером оксидативного стресу та застосовується для оцінки його впливу на організм.

Робота 19. Визначення вмісту карбонільних груп у білках

Мета роботи: оволодіти методикою вимірювання вмісту карбонільних груп у листках рослин.

Обладнання та реактиви: ступки з товчачиками, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, термостат, спектрофотометр, кювети для спектрофотометра, промивалка, фільтрувальний папір, екстракційний буфер (50 мМ калій-фосфатний буфер ($pH=7,0$), 0,5 мМ ЕДТА), 10 мМ 2,4-денітрофенілгідразин (ДНФГ), 40% ТХО, 6 М гуанідин- HCl , 2 М HCl , етанол, етилацетат.

Хід роботи

1. 250–300 мг листків досліджуваних рослин помістіть у фарфорову ступку та розітріть у рідкому азоті до однорідної маси.
2. Додайте 750 мкл екстракційного буфера та кількісно перенесіть у мікроцентрифужну пробірку об'ємом 2 мл.

3. Проінкубуйте зразки протягом 10 хв за температури +4 °С.
4. Відцентрифугуйте проби при 12000 g протягом 10 хв.
5. Перенесіть 375 мкл отриманого супернатанту у чисту пробірку та додайте 750 мкл 10 мМ ДНФГ в 2 М НСІ.
6. Приготуйте контрольну пробу; для цього змішайте 375 мкл екстракту та 750 мкл 2 М НСІ.
7. Перемішайте зразки та проінкубуйте їх протягом 1 години в темряві за температури 20–25 °С.
8. Після інкубації для осадження білків до кожної з проб додайте по 750 мкл 40 % ТХО та обережно перемішайте.
9. Відцентрифугуйте зразки протягом 15 хв при 12000 g.
10. Відберіть отриманий супернатант і вилийте його.
11. До осаду додайте 1 мл суміші 96 %-й етиловий спирт: етилацетат у співвідношенні 1:1.
12. Обережно перемішайте та відцентрифугуйте при 13500 g протягом 10 хв.
13. Відберіть супернатант і повторіть пп. 11–12 тричі.
14. Підсушіть осад, який залишився у мікропробірках, за кімнатної температури протягом 20–30 хв.
15. Додайте до осаду 1 мл 6 М гуанідин гідрохлориду та проінкубуйте отримані проби у темряві протягом 30–40 хв до повного його розчинення.
15. Визначте оптичну густину проб на спектрофотометрі за довжини хвилі 370 нм (лампа розжарення).
16. Виміряйте кількість білка у пробі за методом Бредфорда.
17. Розрахуйте вміст карбонільних груп у білку, застосовуючи при розрахунках K_{ex} , який складає $22000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ при довжині хвилі 370 нм.

Запитання та завдання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте основні функції білків у рослинній клітині.
2. Які фізико-хімічні властивості білків Вам відомі?
3. Розкрийте принцип методу виділення загального білка за наявності сечовини.
4. Які існують методи визначення кількості загального білка у пробі?
5. Опишіть основні вимоги під час кількісного визначення білка.
6. На чому ґрунтуються методики визначення кількості білка?

ФЕРМЕНТИ

Основні «робочі інструменти» клітини – це білки-ферменти, які каталізують проходження метаболічних реакцій та спрямовують їх у необхідному напрямку. Тому при вивченні багатьох клітинних процесів на біохімічному рівні часто необхідно визначити активність певних ферментів. Один і той же фермент може мати різну активність у різних органах і тканинах, залежно від віку організму, умов вирощування та живлення, впливу навколишнього середовища. Активність ферментів залежить від температури та рН середовища, концентрації субстрату та наявності активаторів або інгібіторів. Ці фактори необхідно враховувати як при описуванні функції певного ферменту безпосередньо у живій клітині, так і при вивченні його властивостей *in vitro*.

Визначення активності ферментів

Вимірювання активності ферментів ґрунтується на визначенні, яка кількість субстрату певного ферменту розщеплена або скільки продукту реакції утворилося за одиницю часу. Отримане значення перераховують на вміст білка у пробі або інколи на масу наважки, з якої отримана проба. Іноді для розуміння певного біохімічного процесу доцільно перерахувати активність ферменту на вміст певної речовини, яка має причетність до цього процесу. Наприклад, при вивченні фотосинтезу активність відповідних ферментів можна перераховувати на вміст хлорофілу.

Кількість ферментного субстрату або продукту реакції вимірюють безпосередньо чи опосередковано. Для безпосереднього вимірювання, як правило, застосовують спектрофотометричний

спосіб. Вимірювання оптичної густини проби проводять при певній довжині хвилі світла, характерній для даного субстрату або продукту реакції. Якщо ж це неможливо, то до проби додають допоміжні речовини, які реагують із субстратом чи продуктом ферментної реакції, в результаті чого виникає забарвлення, інтенсивність якого вимірюють на спектрофотометрі чи на фотоколориметрі.

Приготування білкового екстракту для визначення активності ферментів має забезпечити збереження їх активності і тому має такі особливості:

- виділення проводиться на холоді;
- буфер для екстракції не повинен містити денатуруючі агенти (ДДС-Na, сечовину);
- додатковими складовими буфера можуть бути стабілізуючі агенти. Наприклад, при виділенні каталази або аскорбатпероксидази в екстрагуючий розчин обов'язково додають гліцерол. Для виділення аскорбатпероксидази важливо додавати аскорбат, за відсутності якого вона швидко втрачає свою активність;
- необхідно враховувати стабільність ферментів у часі. Якщо досліджуються ферменти, які досить швидко втрачають активність (наприклад, аскорбатпероксидаза), необхідно працювати швидко, заздалегідь підготувавши все необхідне.

АФК та ферменти, залучені до стресової відповіді

Кисень життєво необхідний усім аеробним організмам для продукування енергії при перенесенні електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій. Водночас кисень – джерело утворення АФК *in vivo*. АФК – це низькомолекулярні сполуки, які містять атоми кисню та мають один або більше неспарених електронів. Неспарений електрон – дуже реактивний і може вступати в реакції з іншими молекулами, пошкоджуючи їх.

До основних видів АФК належать синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), супероксидний аніон-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), пероксид водню (H_2O_2) та гідроксильний радикал ($\text{HO}^{\bullet}$). Вони дають початок низці інших радикалів – окиснених галогенів ($\text{ClO}^{\bullet}$), оксидів азоту ($\text{NO}^{\bullet}$) та ініціюють вільнорадикальне пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ). Крім токсичної дії, пероксид водню у клітині має сигнальну роль при активації відповіді на різні форми стресу.

У рослинній клітині за оптимальних умов зростання АФК постійно утворюються як нормальний метаболічний продукт у малих кількостях в електронно-транспортних ланцюгах хлоропластів і мітохондрій, а також у пероксисомах та гліоксисомах. Концентрація АФК підтримується на постійному рівні завдяки збалансованому функціонуванню складної та високоспецифічної системи, яка охоплює ферментативні та неферментативні механізми антиоксидантного захисту. За дії низки факторів зовнішнього середовища таких як ультрафіолетове випромінювання, радіація, екстремальні температури, посуха, накопичення солей важких металів, тощо може виникати дисбаланс між продукуванням та їх знешкодженням, що призводить до надмірного зростання концентрації АФК, а отже - до оксидативного стресу.

Захист від АФК та підтримку окисно-відновної рівноваги у рослинній клітині забезпечують численні антиоксидантні ферменти, такі як гваяколпероксидаза (POD), каталаза (CAT), поліфенолоксидаза (PPO), супероксиддисмутаза (SOD) та ферменти аскорбат-глутатіонового циклу – аскорбатпероксидаза (APX), дегідроаскорбат редуктаза (DHAR), глутатіонредуктаза (GR) та інші. Залежно від дії стресових факторів на рослини ці ферменти можуть змінювати активність. Тому дослідження активності ферментів антиоксидантного захисту важливе для розуміння механізмів відповіді рослинної клітини на дію стресових чинників.

Крім антиоксидантних ферментів, у захисній відповіді рослинної клітини на стресові впливи беруть участь такі ферменти як глутатіон-S-трансфераза (GST), ліпоксигеназа (LOX), фенілаланінамонійліаза (PAL).

Аскорбатпероксидаза, APX (EC 1.11.1.11) – один із головних ферментів антиоксидантної системи рослинної клітини, компонент аскорбат-глутатіонового циклу. APX належить до класу гем-вмісних пероксидаз; каталізує окисно-відновну реакцію, в якій пероксид водню (H_2O_2) відновлюється до води, а Asc окислюється до DHA. APX особливо активна у зелених тканинах. Активність APX зростає в умовах стресу, напр., при підвищеній температурі вирощування або за дії надмірного освітлення. APX кодується мультигенною родиною, яка зазвичай нараховує близька 10 генів.

Дегідроаскорбатредуктаза, DHAR (EC 1.8.5.1) - один з ферментів аскорбат-глутатіонового циклу. DHAR відновлює DHA до Asc, використовуючи GSH як відновлюючий агент. DHAR міститься в багатьох тканинах рослин, зокрема у листі, стеблах та плодах і відіграє важливу роль у захисті від окисдативного стресу. Надекспресія у тютюні гена, що кодує DHAR забезпечує толерантність до надлишку алюмінію, сольового стресу та низьких температур стресу.

Гваяколпероксидаза, POD (EC 1.11.1.7) – гем-вмісний фермент, який каталізує окислення пероксидом водню, органічними пероксидами або молекулярним киснем різних субстратів, напр. поліфенолів, які містяться у рослинних тканинах у вільному стані або у формі різноманітних сполук (глікозиди та дубильні речовини), та ароматичних амінів. На відміну від APX, POD активна переважно у тканинах кореня та плодах. Функції POD включають *синтез ароматичних сполук*: POD відіграє важливу роль у синтезі таких сполук, як гваяколова кислота та ін. Ці сполуки мають різкий аромат і часто використовуються в харчовій промисловості. *Захист від патогенів*: деякі продукти, які синтезуються за участі POD, мають антимікробну активність.

Регуляція росту і розвитку: POD бере участь у проростанні насіння, розвитку квіток і плодів. Кодується мультигенною родиною, яка може нараховувати десятки членів.

Глутатіонредуктаза, GR (EC 1.8.1.7) – один з ферментів аскорбат-глутатіонового циклу, каталізує відновлення окисленої форми глутатіону (GSSG) до відновленої форми (GSH). У рослин кодується мультигенною родиною.

Глутатіон-S-трансферази, GST (EC 2.5.1.18) - це велика родина ферментів, які каталізують перенесення залишку глутатіону на електрофільні субстрати, що збільшує їх водорозчинність. GST мають багато функцій (деякі з яких все ще невідомі), головною з яких вважають детоксикацію ксенобіотиків. Проте, GST також забезпечують детоксикацію ряду ендогенних токсинів, як от продукти перекисного окислення ліпідів. GST представлена набором кількох ізоферментів, які відрізняються за своєю структурою, функцією та клітинною локалізацією. Характерною особливістю генів GST є їх активація за стресових умов.

Каталаза, CAT (EC 1.11.1.6) – фермент класу оксидоредуктаз, який каталізує реакції дисмутації пероксиду водню (H_2O_2) до молекули води та кисню. Вона зустрічається майже у всіх живих організмах і відіграє життєво важливу роль у захисті клітин від окиснювального пошкодження. Молекула CAT складається з чотирьох гем-вмісних мономерів. CAT переважно локалізована в пероксисомах, де вона забезпечує розщеплення пероксиду водню, що утворюється при фотодиханні та інших метаболічних реакціях. CAT також присутня в інших клітинних компартментах, зокрема у цитоплазмі та мітохондріях. У рослин кодується маленькою мультигенною родиною, яка як правило включає три гени. Експресія окремих генів залежить від стадії розвитку рослин і впливу зовнішніх чинників. Активність CAT також регулюється на пост-транскрипційному рівні та може змінюватись у відповідь на дію різноманітних стресових факторів абіотичної природи.

Ліпоксигенази (LOX – лінолеат: кисень: оксидоредуктази; EC 1.13.11.12) – родина ферментів, які знайдено у рослин, грибів і тварин. LOX каталізують приєднання молекулярного кисню до цис, цис-1,4-пентадієнового фрагменту поліненасичених жирних кислот, лінолевої, ліноленової та α -ліноленової. Окиснення лінолевої кислоти є першою ланкою розгалуженого ферментативного каскаду, активність якого забезпечує утворення біологічно активних сполук – оксиліпінів. Саме вони задіяні у формуванні відповіді рослинного організму на дію абіотичних і біотичних стресових чинників, беруть участь у синтезі сполук, які мають антимікробну активність, а також залучені до процесів, пов'язаних із проростанням насіння, розвитком квіток і плодів, старінням і апоптозом клітин.

Поліфенолоксидаза, PPO (EC 1.10.3.2), як і пероксидаза, відіграє важливу роль у диханні рослин. Поліфенолоксидаза окислює феноли з утворенням хінонів, у результаті чого мобілізований водень фенолів зв'язується з киснем з утворенням води. У живій клітині хінони знову відновлюються до фенолів.

Супероксиддисмутаза, SOD (E.C. 1.15.1.1) – фермент, який каталізує дисмутацію супероксидних радикалів ($O_2^{\cdot -}$) до молекулярного кисню (O_2) і пероксиду водню (H_2O_2). SOD наявна у всіх живих клітинах. У рослинах цей фермент знайдено у всіх тканинах, зокрема у листі, стеблах та коренях. SOD присутня у кількох компартментах – цитоплазмі, мітохондріях та хлоропластах. SOD перетворює супероксидні радикали на менш шкідливі молекули, кисень і пероксид водню і є один із ключових гравців у системі *захисту від оксидативного стресу*. Також бере участь у *синтезі ароматичних сполук*, напр., катехінів і флавоноїдів. Залежно від наявності металу в активному центрі ферменту розрізняють три типи ферменту – CuZn SOD, Mn SOD або Fe SOD. Ізоформи SOD кодуються мультигенною родиною.

Фенілаланінамонійліаза, PAL (EC 4.3.1.24) – каталалізує перетворення амінокислоти фенілаланіну в коричну кислоту з виділенням аміаку. Цей процес відбувається в цитоплазмі рослинних клітин. PAL відіграє важливу роль у метаболізмі рослин. Вона є першим ферментом у шляху синтезу фітогормонів, таких як ауксини, цитокініни і гібереліни. PAL також бере участь у синтезі антиоксидантів, таких як фенольні сполуки. У рослинах гени PAL експресується в різних тканинах, зокрема у листі, стеблах, коріннях і квітах. Активується PAL зростає при стресі, наприклад, при посусі або механічному травмуванні.

Робота 20. Визначення активності аскорбат- та гваяколпероксидаз в одному екстракті спектрометричним методом

Мета: визначити активність APX та POD у зелених частинах рослин.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, секундомір, ступки та товчачики, склянки, мікроцентрифужні пробірки типу «Епандорф», набір автоматичних дозаторів і наконечники до них, кварцові кювети, рідкий азот, лід, сухий полівінілпіролідон, екстракційний буфер (50 мМ натрій-фосфатний буфер (pH=7,0), 0,25 мМ ЕДТА, 2 %-й полівінілпіролідон, 10 %-й гліцерол, 0,5 мМ аскорбат); реакційний буфер для вимірювання активності APX (25 мМ натрій фосфатний буфер (pH=7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 1 мМ H₂O₂), реакційний буфер для вимірювання активності POD (25 мМ ацетат натрію (pH=5,0), 8 мМ розчин гваяколу, 9 мМ H₂O₂), 2,5 мМ розчин аскорбату, реактив Бредфорда.

Хід роботи

1. 100 мг рослинного матеріалу залийте у ступці рідким азотом і швидко гомогенізуйте. Залийте 500 мкл екстракційного буфера (НЕ ДОПУСКАЙТЕ РОЗМОРОЖУВАННЯ МАТЕРІАЛУ ЗАВІДСУТНОСТІ БУФЕРА!)

Примітка. APX – це дуже термолабільний та нестабільний при виділенні фермент. Тому для збереження його активності всі маніпуляції з ферментом проводяться на холоді.

2. Перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку та відцентрифугуйте на холоді (2–4 °C) 10 хв при 15 000 g (13 000 об/хв, центрифуга Biofuge pico).

3. Відберіть супернатант, який містить розчинну фракцію білків, перенесіть у чисту мікропробірку, поставте на лід і якомога швидше використовуйте для вимірювання активностей аскорбат і гваякол пероксидаз.

Оскільки аскорбатпероксидаза досить швидко втрачає свою активність навіть на льоду, спочатку виміряйте її активність, а потім – гваяколпероксидази.

Вимірювання активності APX

4. Налийте в контрольну кварцову кювету 875 мкл реакційного буфера для вимірювання активності APX, додайте 100 мкл 2,5 mM аскорбату та 25 мкл екстракційного буфера, перемішайте.

5. Налийте у дослідну кварцову кювету 875 мкл реакційного буфера для вимірювання активності APX, додайте 100 мкл 2,5 mM аскорбату та перемішайте.

6. Додайте в дослідну кювету 25 мкл білкового екстракту (супернатант з пункту 3), швидко перемішайте, зразу ж увімкніть секундомір і запишіть показник спектрофотометра при довжині хвилі 290 нм.

7. Через 1 хв запишіть показник спектрофотометра знову.

8. Виміряйте вміст білка в екстракті за методом Бредфорда.

9. Розрахуйте активність ферменту за формулою:

$$A = (OD_1 - OD_2) \times K_{ex}^{-1} \times L^{-1} \times V_c \times (P \times V_{pr})^{-1} \times T^{-1},$$

де A – активність ферменту;

OD_1 – оптична густина розчину в кюветі при першому вимірюванні;

OD_2 – оптична густина розчину при другому вимірюванні;

K_{ex} – коефіцієнт екстинкції (K_{ex} для аскорбату при довжині хвилі 290 нм складає $2,8 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$);

L – довжина оптичного шляху (товщина кювети), см;

V_c – загальний об'єм реакційної суміші у кюветі, мл;

P – концентрація білка в білковому екстракті, мг/мл;

V_{pr} – об'єм білкового екстракту, внесеного у кювету, мл;

T – час, хв.

Примітка: активність ферменту виражають у мкмоль використаного субстрату на мг білка у пробі за одну хвилину.

Вимірювання активності POD

10. У контрольну кювету налейте 975 мкл реакційного буфера для вимірювання активності POD та 25 мкл екстракційного буфера, перемішайте.

11. У дослідну кювету налейте 975 мкл реакційного буфера для вимірювання активності POD, додайте 25 мкл білкового екстракту, ввімкніть секундомір, швидко перемішайте і запишіть показник спектрофотометра при довжині хвилі 470 нм через 10, 40 та 70 секунд від початку реакції.

13. Розрахуйте активність ферменту за формулою, яка наведена вище для розрахунку активності APX. При розрахунках використовуйте K_{ex} для гваяколу, який складає: $26,6 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при довжині хвилі 470 нм.

Робота 21. Визначення активності глутатіонредуктази

Мета: визначити активність глутатіонредуктази у рослинному екстракті.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, секундомір, ступки та товкачики, стакани, мікроцентрифужні пробірки типу «Епендорф», набір автоматичних дозаторів та наконечники до них, кювети для спектрофотометра, рідкий азот, лід, екстракційний буфер (50 мМ трис-НСІ (рН=7,5), 10% гліцерол, 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ GSH, 1% PVP; реакційний буфер (25 мМ калій-фосфатний буфер (рН=7,8), 0,5 мМ GSSG, 0,12 мМ НАДФ-Н), реактив Бредфорда.

Хід роботи

1. 100 мг замороженого рідким азотом рослинного матеріалу швидко гомогенізуйте та залийте 500 мкл екстракційного буфера (НЕ ДОПУСКАЙТЕ ВІДТАНЕННЯ МАТЕРІАЛУ ЗА ВІДСУТНОСТІ БУФЕРА!)

2. Перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку та відцентрифугуйте на холоді (2–4°C) 10 хв при 15 000 g.

3. Обережно, не торкаючись осаду, відберіть супернатант, який містить розчинну фракцію білків, перенесіть у чисту мікропробірку та помістіть на лід.

4. Змішайте у кюветі 980 мкл реакційного буфера та 20 мкл білкового екстракту, швидко перемішайте та ввімкніть секундомір.

5. Помістіть кювету у спектрофотометр та за 3 хв запишіть показники при довжині хвилі 412 нм.

6. У контрольну кювету замість білкового екстракту додайте 20 мкл екстракційного буфера.

7. Розрахуйте активність ферменту за зниженням абсорбції, враховуючи коефіцієнт екстинції $6.2 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$

Примітка: активність ферменту виражають у мкмоль використаного субстрату на мг білка в пробі за одну хвилину.

Робота 22. Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Мета: визначити активність глутатіон-S-трансферази у рослинному екстракті.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, секундомір, ступки та товкачики, стакани, мікроцентрифужні пробірки типу «Епендорф», набір автоматичних дозаторів та наконечники до них, кварцові кювети, рідкий азот, лід, екстракційний буфер (100 мМ натрій фосфатний буфер (рН=7,5), 0,5 мМ ЕДТА); реакційна суміш для вимірювання активності ферменту (100 мМ натрій-фосфат (рН=7,4), 1 мМ ЕДТА, 2,5 мМ GSH відновлений та 1 мМ розчин 1-хлор-2,4-динітробензену (ХДНБ) як субстрат), реактив Бредфорда.

Хід роботи

1. 100 мг замороженого рідким азотом рослинного матеріалу швидко гомогенізуйте та залийте 500 мкл екстракційного буфера (НЕ ДОПУСКАЙТЕ ВІДТАНЕННЯ МАТЕРІАЛУ ЗА ВІДСУТНОСТІ БУФЕРА!)

2. Перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку та відцентрифугуйте на холоді (2–4 °С) 10 хв при 15 000 g (13 000 об/хв, центрифуга Biofuge pico).

3. Обережно, не торкаючись осаду, відберіть супернатант, який містить розчинну фракцію білків, перенесіть у чисту мікропробірку та помістіть на лід.

4. Паралельно приготуйте контрольну та дослідну проби. Для цього у дві кварцові кювети внесіть по 900 мкл реакційного буфера та додайте 100 мкл екстракційного буфера (контрольна проба), або 100 мкл рослинного екстракту (дослідна проба). Швидко перемішайте проби та ввімкніть секундомір.

5. Виміряйте оптичну густина дослідної проби проти контрольної зразу після перемішування та за 2 хв при довжині хвилі 340 нм.

Увага! Оптична густина контрольної проби має властивість змінюватись в часі.

6. Поміряйте кількість білка у дослідній пробі.

7. Активність ферменту розрахуйте як нмоль утвореного ХДНБ-кон'югату на мг білка в пробі за одну хвилину, використовуючи коефіцієнт молярної абсорбції $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Робота 23. Визначення активності дегідроаскорбат-редуктази

Мета: оволодіти методом і визначити активність DHAR у різних частинах рослини.

Обладнання та реактиви: ступки з товкачиками, електронні ваги, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, мірні скляні пробірки, спектрофотометр, фотоелектрокалориметр, кювети кварцові, промивалка, фільтрувальний папір, екстракційний буфер (50 мМ трис-НСІ (рН=7,4), 100 мМ хлорид натрію, 2 мМ ЕДТА), реакційний буфер (50 мМ калій-фосфатний буфер (рН=7,0), 2 мМ відновлений глутатіон), 0,2 мМ дегідроаскорбат, вода дистильована.

Хід роботи

1. Помістіть у фарфорову ступку 100–200 мг рослинного матеріалу та розітріть у рідкому азоті до однорідної маси (НЕ ДОПУСКАЙТЕ РОЗМОРОЖУВАННЯ).

2. Додайте 300–400 мкл охолодженого екстракційного буфера, перемішайте та кількісно перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку.

3. Ретельно перемішайте вміст проб і відцентрифугуйте при 15000 g протягом 10–12 хв в охолодженій центрифугі.

4. Перенесіть отриманий супернатант у чисту мікропробірку та зберігайте на льоду для подальшого визначення активності ферменту.

5. Активність DHAR визначте спектрофотометрично за довжини хвилі 265 нм (УФ-лампа). Для цього у контрольну кювету додайте 1,0 мл реакційного буфера.

6. У дослідну кювету внесіть 890 мкл реакційного буфера та додайте 100 мкл свіжоприготовленого 2 мМ дегідроаскорбату і 10 мкл білкового екстракту. Увімкніть секундомір та швидко перемішайте.

7. Виміряйте оптичну густину дослідної проби проти контрольної через 10 секунд, 1, 2 та 3 хв після додавання білкового екстракту.

8. Вміст білка у пробі визначте за методом Бредфорда.

9. Розрахуйте активність DHAR за формулою, наведеною вище для розрахунку активності APX. При розрахунках використовуйте K_{ex} для дегідроаскорбату, який складає: $14,0 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при довжині хвилі 265 нм.

Робота 24. Визначення активності каталази

Мета: оволодіти методом визначення активності каталази в різних тканинах рослин, вивчити роль каталази в метаболізмі рослинного організму.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, водяна баня, секундомір, ступки та товкачики, склянки, мірні скляні пробірки, штативи для пробірок, набір автоматичних дозаторів і наконечники до них, кювети, рідкий азот, промивалка, фільтрувальний папір, екстракційний буфер (0,1 М трис-НСІ (рН 6,8), 20 %-й гліцерол, 30 мМ дітіотрейтол, 0,1%-й нерозчинний

полівінілполіпіролідон), 1 М пероксид водню, 4%-й молібдат амонію, дистильована вода.

Каталазну активність визначають за методом, який ґрунтується на здатності молібдату амонію утворювати з пероксидом водню комплекси жовтого забарвлення, інтенсивність яких потрібно вимірювати спектрофотометрично.

Хід роботи

1. Помістіть у фарфорову ступку та гомогенізуйте у рідкому азоті 100–150 мг рослинного матеріалу (НЕ ДОПУСКАЙТЕ РОЗМОРОЖУВАННЯ).

2. Додайте 300 мкл охолодженого екстракційного буфера, перемішайте та кількісно перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку.

3. Закрийте пробірку, інтенсивно перемішайте її вміст та інкубуйте протягом 5 хв за температури +4 °С.

4. Відцентрифугуйте проби на холоді при 15000 g протягом 15 хв.

5. Перенесіть отриманий супернатант у чисту мікропробірку і центрифугуйте ще раз протягом 5 хв.

6. Отриманий білковий екстракт зберігайте на льоду для подальшого визначення активності ферменту.

7. Налийте у чисті пробірки на 10 мл 0,5 мл 4 %-го розчину молібдату амонію та залиште для наступного кроку.

8. У чисту центрифужну пробірку на 10 мл внесіть 100 мкл білкового екстракту та додайте 1,9 мл реакційного буфера; швидко перемішайте, відберіть 1 мл та зразу додайте до пробірки з молібдатом амонію (приготовленої у пункті 7) для зупинки реакції (нульова проба).

9. Решту реакційної суміші (1 мл) проінкубуйте протягом 1 хв за температури 25 °С.

10. Зупиніть реакцію додаванням 0,5 мл 4 %-го розчину молібдату амонію (дослідна проба).

11. Виміряйте оптичну густину отриманих проб спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм.

12. Каталазну активність розрахуйте, порівнюючи вміст пероксиду водню у пробі на початку реакції (нульова проба) та після її припинення (дослідна проба).

13. Кількість розщепленого пероксиду водню у пробі вирахуйте за допомогою калібрувального графіка.

14. Активність ферменту розрахуйте за такою формулою:

$$((HP_0 - HP_1)/T)/P,$$

де, HP_0 – вміст пероксиду водню (мкмоль) у нульовій пробі у початковий момент часу; HP_1 – вміст пероксиду водню у дослідній пробі після закінчення інкубації; T – тривалість інкубації (хв); P – кількість білка у пробі (мг).

Активність ферменту виражають у мікромольх H_2O_2 , розщеплених за 1 хв на 1 мг білка. Вміст білка у пробі визначають за методом Бредфорда.

Робота 25. Визначення активності ліпоксигенази

Мета: оволодіти методикою визначення активності LOX у рослинному матеріалі.

Обладнання та реактиви: ступки з товчачиками, електронні ваги, мікроцентрифужні пробірки, штативи для пробірок, мікропіпетки, наконечники для мікропіпеток, центрифуга, спектрофотометр, лід, фотоелектрокалориметр (ФЕК), кювети кварцові, промивалка, фільтрувальний папір, екстракційний буфер (100 мМ калій-фосфатний буфер, (рН=7,3), 1%-й тритон X-100, 0,04%-й метабісульфіт натрію), реакційний буфер (50 мкл лінолевої кислоти та 170 мкл Tween-20 на 100 мл 100 мМ калій-фосфатного буфера (рН=7,3)).

Хід роботи

1. Помістіть 200 мг рослинного матеріалу у фарфорову ступку та розітріть у рідкому азоті до однорідної маси. Додайте 1 мл охолодженого екстракційного буфера та ретельно перемішайте (НЕ ДОПУСКАЙТЕ РОЗМОРОЖУВАННЯ МАТЕРІАЛУ ЗАВІДСУТНОСТІ БУФЕРА!)

2. Перенесіть отриманий гомогенат у мікропробірку та інкубуйте протягом 5 хв за температури +4 °С.

3. Відцентрифугуйте пробу при 15000 g протягом 10 хв за температури +4 °С.

4. Перенесіть супернатант у чисту мікропробірку та зберігайте на льоду для подальшого визначення активності ферменту.

5. Додайте у контрольну кювету спектрофотометра 1,95 мл реакційного буфера та 50 мкл екстракційного буфера.

6. У дослідну кювету додайте 1,95 мл реакційного буфера та 50 мкл білкового екстракту.

7. Виміряйте оптично густину дослідної проби проти контрольної за довжини хвилі 234 нм через 10 секунд, 1, 2, 3 та 4 хв після початку реакції.

8. Виміряйте вміст білка у пробі за методом Бредфорда.

9. Розрахуйте активність ферменту за коефіцієнтом екстинції гідропероксиду $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ та перерахуйте у мкмоль гідропероксиду $\times \text{хв}^{-1} / \text{мг білка}$.

Робота 26. Визначення активності поліфенолоксидази

Мета роботи: порівняти активність поліфенолоксидази у різних тканинах рослин.

Обладнання та реактиви: вага, ФЕК, центрифуга, секундомір, ступки з товчачиками, склянки, колби, мірні пробірки, мірні циліндри, шпателі, центрифужні пробірки, кювети, екстракційний буфер (50 мМ натрій-фосфатний буфер (pH=7,4), 0,25 мМ ЕДТА, 10 %-й гліцерол, 1 мМ аскорбат),

реакційний буфер (50 мМ натрій-фосфатного буфера (рН=7,4), 0,02 %-й диметил-1,4-фенілендіамін; 0,25 %-й пірокатехін), бідистильована вода, листя, лушпиння та бульби картоплі.

Принцип методу визначення активності поліфенолоксидази оснований на вимірюванні швидкості окислення диметил-1,4-фенілендіаміну з утворенням синьо-фіолетової сполуки.

Хід роботи

1. Приготуйте розчини, необхідні для роботи:
2. Розітріть 300 мг рослинного матеріалу в рідкому азоті до однорідної маси.
3. Додайте 1 мл охолодженого екстракційного буфера та перемішайте.
3. Перенесіть отриманий гомогенат у чисту мікроцентрифужну пробірку.
4. Добре перемішайте та залишіть на 10–15 хв на льоду.
5. Відцентрифугуйте при 15000 g протягом 10 хв на холоді.
6. Отриманий супернатант перенесіть у чисту мікропробірку та зберігайте на льоду для подальшого визначення активності ферменту.
7. Для вимірювання активності ферменту у дві кювети (дослідна та контрольна) налийте по 2,7 мл реакційного буфера.
8. У контрольну кювету додайте 300 мкл екстракційного буфера.
9. У дослідну кювету додайте по 300 мкл білкового екстракту.
10. Виставте дослідну пробу проти контрольної та зніміть показники спектрофотометра при 470 нм через 10 секунд, 1 та 2 хв після додавання білкового екстракту.
11. Визначте вміст білка у пробі за методом Бредфорда.

12. Розрахуйте активність ферменту за формулою:

$$A = (OD_1 - OD_2) \times L^{-1} \times (P \times V_{\text{пр.}})^{-1} \times T^{-1},$$

де А – активність ферменту,

OD₁ – оптична густина розчину в кюветі при першому вимірюванні,

OD₂ – оптична густина розчину при другому вимірюванні,

V_{пр.} – об'єм білкового екстракту, внесеного у кювету, мл,

T – час, хв,

P – кількість білка в 1 мл білкового екстракту, мг,

L – довжина оптичного шляху (товщина кювети), см

Активність ферменту виражають як зміну оптичної густини на мг білка у пробі за одну хвилину.

Робота 27. Оцінка активності супероксиддисмутази спектральним методом

Мета: визначити активність SOD у рослинному екстракті.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, секундомір, ступки та товчачики, стакани, мікроцентрифужні пробірки типу «Епандорф», набір автоматичних дозаторів та наконечники до них, кювети для спектрофотометра, рідкий азот, лід, екстракційний буфер (100 мМ натрій фосфатний буфер (pH=7,5), 0,5 мМ ЕДТА); реакційна суміш для вимірювання активності SOD (13,33 мМ метіонін, 75 мкМ NBT, 0,1 мМ ЕДТА, 50 мМ натрій фосфатний буфер (pH 7,8), реактив Бредфорда.

Хід роботи

1. 100 мг замороженого рідким азотом рослинного матеріалу швидко гомогенізуйте та залийте 500 мкл екстракційного буфера (НЕ ДОПУСКАЙТЕ ВІДТАНЕННЯ МАТЕРІАЛУ ЗА ВІДСУТНОСТІ БУФЕРУ!)

2. Перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку та відцентрифугуйте на холоді (2–4 °C) 10 хв при 15 000 g.

3. Обережно, не торкаючись осаду, відберіть супернатант, який містить розчинну фракцію білків, перенесіть у чисту мікропробірку та помістіть на лід.

4. Приготуйте три чашки Петрі діаметром 35 мм (для дослідного зразка, світлового та темнового контролів). У кожную з них налейте 3 мл реакційної суміші.

5. У дві чашки Петрі – дослідна проба та темнова контрольна проба – додайте по 100 мкл 82,2 мМ рибофлавіну та 100 мкл ферментного екстракту. Швидко ретельно перемішайте. Дослідну пробу помістіть на 15 хв на столик з освітленням люмінесцентними лампами 30 Вт, а темновий контроль – у темне місце.

6. У третю чашку Петрі - світловий контроль - додайте 100 мкл 82,2 мМ рибофлавіну та 100 мкл екстракційного буфера. Перемішайте та помістіть під лампи разом із дослідною пробою.

7. Через 15 хв виміряйте на спектрофотометрі оптичну густину розчинів із кожної проби при довжині хвилі 560 нм та запишіть показники. Від показника оптичної густини дослідної проби відніміть показник темнового контролю.

Примітка: За дії світла на рибофлавін у дослідній та темновій контрольній пробах відбувається генерація супероксидних радикалів $O_2^{\cdot-}$, які взаємодіють із NBT з утворенням формазану, що забарвлений у темно-синій колір. У дослідній пробі завдяки активності SOD відбувається дисмутація $O_2^{\cdot-}$, що інгібує утворення формазану. Цей ефект використовують для визначення активності SOD.

8. Виміряйте кількість білка в екстракті за методом Бредфорда.

9. Розрахуйте активність ферменту. Для цього оцініть відсоток інгібування утворення формагану у дослідній пробі. Визначте об'єм ферментного екстракту, який необхідний для зниження утворення формагану на 50%. Такий об'єм екстракту відповідає 1 од. активності SOD. Перерахуйте активність ферменту на вміст білка у пробі.

Робота 28. Визначення активності феніланінамоніліази спектральним методом

Мета: визначити активність феніланінамоніліази в рослинному екстракті.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, секундомір, ступки та товчачики, стакани, мікроцентрифужні пробірки типу «Епендорф», набір автоматичних дозаторів та наконечники до них, кювети для спектрофотометра, рідкий азот, лід, екстракційний буфер (25 мМ натрій-боратний буфер, pH 8,9; 80 мкМ β-меркаптоетанол), 2,5 мМ натрій-боратний буфер, 5 мМ розчин L-феніланіну, 5 М HCl, розчини коричневої кислоти з концентраціями 3, 6, 9, 12, 15, 18 мкМ, реактив Бредфорда.

Хід роботи

1. 200 мг замороженого рідким азотом рослинного матеріалу швидко гомогенізуйте у ступці товчачиком та залийте 1 мл екстракційного буфера (НЕ ДОПУСКАЙТЕ ВІДТАНЕННЯ МАТЕРІАЛУ ЗА ВІДСУТНОСТІ БУФЕРА!)

2. Перенесіть гомогенат у мікроцентрифужну пробірку та відцентрифугуйте на холоді (2–4 °C) 15 хв при 15 000 g.

3. Обережно, не торкаючись осаду, відберіть супернатант, який містить фракцію розчинних білків, перенесіть його у чисту мікропробірку та помістіть на лід.

4. У чисту пробірку внесіть 800 мкл 2,5 мМ натрій-боратного буфера, додайте 200 мкл рослинного екстракту та інкубуйте при 37 °C протягом 3-5 хв.

5. Запустіть реакцію додаванням 30 мкл 5 мМ розчину L-фенілаланіну, швидко перемішайте та ввімкніть секундомір.

6. Інкубуйте пробу протягом 1 години.

7. Зупиніть реакцію додаванням 1 мл 30 % трихлороцтової кислоти.

8. Залиште пробу інкубуватися на водяній бані при 37 °C протягом 30 хв.

9. Паралельно приготуйте контрольну пробу, яка замість рослинного екстракту містить екстракційний буфер.

10. Перенесіть дослідну пробу у кварцову кювету та проведіть вимірювання оптичної густини проти контрольної проби при довжині хвилі 275 нм. Запишіть показники спектрофотометра.

11. Виміряйте кількість білка в екстракті за методом Бредфорда.

12. Вирахуйте концентрацію субстрату, що утворився в результаті реакції за калібрувальною кривою, побудованою для коричної кислоти.

13. Розрахуйте активність ферменту.

Примітка: активність ферменту виражають у мкмоль транс-коричної кислоти на мг білка в пробі за одну хвилину.

Запитання та завдання для самоконтролю

1. Опишіть що таке ферменти?
2. Які чинники впливають на зміну активності ферментів?
3. Охарактеризуйте особливості виділення білкового екстракту для визначення активності ферментів.
4. Що таке АФК? Назвіть основні представники АФК.
5. Розкрийте поняття антиоксидантна система захисту рослин.
6. Які антиоксидантні ферменти Вам відомі? Які їхні основні функції в клітині.
7. Як визначають активність ферментів?
8. Опишіть принцип методу визначення активності каталази.
9. Як відбувається вимірювання активності APX та POD в одному білковому екстракті?
10. Яка роль поліфенолоксидази у рослин? Суть методу визначення її активності.
12. Який принцип вимірювання активності SOD?
13. Яку роль в аскорбат-глутатіоновому циклі виконують DHAR та GR?
14. В чому полягає функція GST?

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ

Електрофорез – це метод розділення молекул за їх зарядом і розміром в електричному полі. Молекули з позитивним зарядом рухаються в напрямку катода, а молекулам з негативним зарядом – у напрямку анода. Швидкість руху молекул в електричному полі залежить від їх заряду: молекули з більшим зарядом будуть рухатися швидше, ніж молекули з меншим зарядом. Проте, при проведенні електрофорезу у розчині конвекція та дифузія будуть суттєво знижувати ефективність фракціонування молекул. Для запобігання цьому електрофорез проводять у агарозному або поліакриламідному гелях. Крім того, використання гелю дозволяє функціонувати молекулу не тільки за зарядом, але й за розміром, оскільки великі молекули сильніше гальмуються гелевою матрицею, ніж маленькі (ефект молекулярного сита).

Агарозний гель у концентрації 0,5-3 % широко використовується в молекулярній біології при проведенні електрофорезу. Він є молекулярним ситом, яке дозволяє фракціонувати відносно великі молекули і в першу чергу застосовується для розділення нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) або білків з великою молекулярною масою. При використанні агарози як матриці застосовують електрофоретичні камери з горизонтальним розташуванням гелю.

Для фракціонування білків та нуклеїнових кислот малої молекулярної маси переважно застосовується метод електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ), який є продуктом спільної полімеризації акриламідів ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) та N,N-метиленабісакриламідів ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$). Як матриця для електрофорезу ПААГ має чимало особливостей, які роблять його зручним для проведення електрофорезу: хімічна стабільність, інертність, прозорість, відсутність адсорбції та електроосмосу. При використанні поліакриламідів застосовують камери з вертикальним розташуванням гелю.

Приготування ПААГ

У процесі полімеризації чистого акриламідів утворюються лише довгі лінійні молекули, які необхідно додатково зшити між собою, щоб отримати тривимірну сітчасту структуру, необхідну для фракціонування білків. Саме для цього до акриламідів додають N,N-метиленбісакриламід, який і вносить до структури гелю розгалуження та поперечні зв'язки між поліакриламідними ланцюгами (рис. 6).

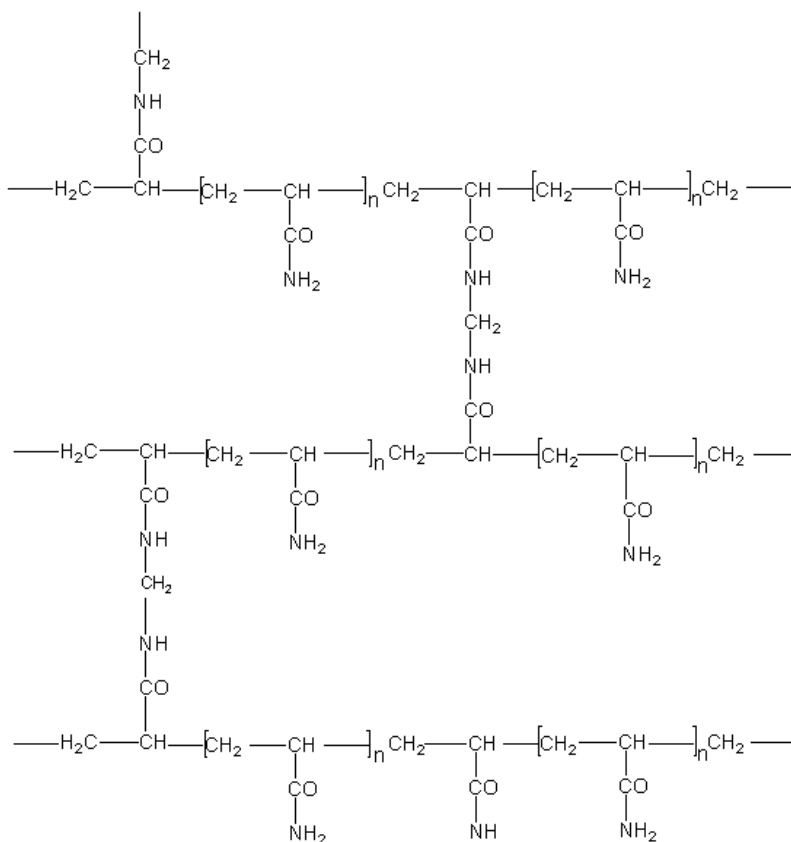


Рис. 6. Хімічна будова поліакриламідного гелю

Розмір пор гелю, в'язкість і пластичність залежать від його концентрації та від ступеня зшивання, тобто від співвідношення між акриламідом і N,N-метиленбісакриламідом. Тож, варіюючи вміст цих двох компонентів, можна змінювати властивості гелю в бажаному напрямку.

Для отримання поліакриламідного гелю концентровані маточні розчини акриламіду та NN-метиленбісакриламіду змішують з відповідним буферним розчином, додають ініціатори та каталізатори полімеризації та заливають суміш у форму, де відбувається формування гелю. Каталізатори не повинні взаємодіяти зі складовими буферного розчину та впливати на електропровідність і в'язкість отриманого гелю.

Такі речовини, як сахароза, гліцерол, сечовина, гуанідин-хлорид, формамід і детергенти (третон X-100, додецилсульфат натрію, цетавлон) не впливають на процес полімеризації. Як ініціатор реакції полімеризації найчастіше використовують амоній персульфат (АПС), а як каталізатор – N,N,N,N-тетраметилендіамін (ТЕМЕД). При розчиненні у воді молекула АПС розпадається на два однакові фрагменти, які являють собою відносно стабільні вільні радикали. Ці радикали викликають розрив подвійного зв'язку у молекулі акриламіду і в такий спосіб стимулюють реакцію полімеризації.

Маточні розчини акриламіду та N,N-метиленбісакриламіду відносно стабільні, їх можна зберігати у холодильнику принаймні місяць. На відміну від цього, АПС нестабільний у розчині, тому його готують безпосередньо перед використанням. При збереженні у замороженому вигляді АПС стабільніший: 10 %-й розчин можна зберігати на мінус 20 °С більш як місяць. Варто також пам'ятати, що молекулярний кисень і низька температура розчину можуть придушити реакцію полімеризації. Тому, при збереженні маточних розчинів у холодильнику їх треба зігріти до кімнатної температури, приготувати суміш компонентів гелю, провести її дегазацію за допомогою водоструменевого насоса і лише після цього додавати ініціатори та каталізатори полімеризації.

Розділення білків у нативних умовах

У багатьох випадках необхідно, щоб після розділення у гелі білки зберігали свою біологічну функцію, наприклад, ферментну активність. У такому разі електрофорез проводять в умовах, які забезпечують збереження нативного стану білкових молекул, а саме - при низьких температурах із використанням відповідних буферних систем. Крім того, до складу гелю вводять спеціальні добавки (наприклад, гліцерол і аскорбат), які стабілізують молекули білка та захищають їх від окислення.

Електрофоретична рухливість біополімерів у гелі залежить від сумарного заряду макромолекули, її маси, розміру та форми. У випадку білка його заряд буде визначатися сумарним зарядом амінокислот, які входять до його складу, що залежить від рН середовища. Отже, заряд білка та його рухливість при електрофорезі можна змінювати через зміну рН буфера.

Найпростішим варіантом при проведенні електрофорезу у ПААГ є застосування однорідної буферної системи з постійним значенням рН як для приготування гелю, так і в ролі електродного буфера. Цей підхід справді застосовується при розділенні малих за розміром молекул ДНК і РНК електрофорезом у ПААГ. Для електрофорезу білків у ПААГ для забезпечення ефективнішого фракціонування застосовується неоднорідна (перервна) розділювальна система, тобто комбінація кількох буферів різної концентрації та з різними значеннями рН. Саме тому метод отримав назву диск-електрофорезу (від англійського слова *discontinuous* – перервний). Для диск-електрофорезу запропоновано кілька буферних систем, які дають змогу фракціонувати білкам у широкому діапазоні рН. Як приклад, розберемо лише одну буферну систему, в якій застосовується комбінація трис-НСІ і трис-гліцинового буферів.

У типовому випадку при диск-електрофорезі використовуються одночасно два гелі – робочий (розділювальний) та концентруючий, який знаходиться безпосередньо над ним. Як видно з назви, у концентруючому гелі білки не розділюються, а навпаки, під дією струму збираються в одну вузьку смугу (ефект Кольрауша) перед входом у робочий гель, де саме й відбувається фракціонування. Оскільки у концентруючому гелі не повинно відбуватися розділення білків, він має низьку концентрацію (4 %) і, відповідно, пори великого розміру. Концентруючий гель містить 0,5 М трис-НСІ буфер, рН 6,8. Робочий гель містить 1,5 М трис-НСІ буфер, рН 8,8. Його концентрацію (розмір пор) можна змінювати від 5 до 20 % залежно від маси білків, які необхідно розділити. Як електродний буфер використовують 1× трис-гліциновий буфер, рН 8,3 (25 мМ трис-НСІ, 20 мМ гліцин).

Висока ефективність фракціонування при диск-електрофорезі зумовлена саме концентруванням зразка після проходження через концентруючий гель, що дає змогу отримати дуже вузькі зони після розділення у робочому гелі. Ефект концентрації зумовлений поведінкою іонів буфера під час електрофорезу, яка залежить від складу, концентрації та рН буферів. Зокрема, необхідною умовою є наявність у складі гелевого буфера швидкорухливих іонів, які мігрують у тому напрямку, що і білки (в даному випадку – іонів Cl^-). Одночасно в електродному буфері повинні знаходитись іони, рухливість яких сильно залежить від рН. Для цього зручно використовувати цвітер-іони, в нашому разі – амінокислоту гліцин ($\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$), ізоелектрична точка якої знаходиться у нейтральній зоні рН ($\text{pI} = 5,97$). Якщо рН середовища зміщується в лужний бік від pI , частина молекул гліцину деіонізується за аміногрупою. Карбоксильні залишки при цьому залишаються негативно зарядженими. При незначному зміщенні рН частка таких негативних молекул буде мала. При подальших змінах рН у лужний бік частина їх зростає.

Розглянемо процеси, які відбуваються під час диск-електрофорезу. Спочатку за дії електричного поля іони Cl^- із концентруючого гелю починають швидко рухатися в напрямку розділювального гелю. На їх місце надходять негативно заряджені білки проби та іони гліцину із верхнього електродного буфера, рН якого 8,3. У концентруючому гелі іони гліцину опиняються при рН 6,8. При переході в кисліше середовище частина цих іонів нейтралізується по карбоксильній групі, що призводить до зменшення концентрації носіїв заряду й електропровідності буфера, а отже, – різкого зростання напруженості електричного поля у концентруючому гелі. Білки, які опинились у гелі в зоні підвищеної напруженості, будуть мігрувати відносно швидко. Жодного розділення поки що відбуватися не буде.

Лінія розділу іонів Cl^- і гліцину буде рухатися далі в напрямку розділювального гелю, який має рН 8,9. Це означає, що при переході у розділювальний гель більшість молекул гліцину знову іонізується по карбоксильній групі. Отже, напруженість електричного поля в цьому гелі буде весь час залишатися низькою. Відповідно, коли перші молекули білка перейдуть у розділювальний гель, де напруженість електричного поля низька, їх міграція різко загальмується. Проте білкові молекули, які йдуть позаду, будуть продовжувати рухатися швидко, доки не досягнуть межі концентруючого та розділювального гелів. Так, задні молекули будуть наздоганяти передні, доки весь об'єм білкового препарату, незалежно від його величини перед нанесенням, не стягується в одну тонку смужку (зону) на самому верху розділювального гелю. Звідси починається повільна міграція білкових молекул у дрібнопористому розділювальному гелі та їх фракціонування за рахунок ефекту молекулярного сита.

Електрофорез білків у денатуруючих умовах

При фракціонуванні білка в нативних умовах розділення залежить від кількох параметрів білкових молекул. Хоча, в багатьох випадках виникає необхідність розфракціонувати суміш білків лише за молекулярною масою, повністю усунувши вплив інших параметрів. Для цього використовують електрофорез у ПААГ за наявності аніонного детергенту ДДС-Na. У порівнянні з білками молекули ДДС-Na мають малий розмір, але великий негативний заряд. При додаванні до білкового препарату надлишку ДДС-Na останній утворює з білками негативно заряджені комплекси. Білкові молекули при цьому розгортаються (денатурують) і набувають однакової конформації незалежно від їхньої амінокислотної послідовності. Негативний заряд, який приносять із собою молекули детергенту, такий великий, що власний заряд білка у складі комплексу з ДДС-Na не відіграє жодної ролі. Це дає змогу проводити електрофоретичне фракціонування білків за наявності ДДС-Na виключно за молекулярною масою. Для підтримання стабільності комплексів ДДС-Na додають не тільки безпосередньо до білкової проби, але й у гель і буфер для електрофорезу. Про такий електрофорез кажуть, що він відбувається у денатуруючих умовах.

Якщо білкова молекула складається з кількох амінокислотних ланцюгів, поєднаних між собою дисульфідними містками, то їх можна зруйнувати додаванням до проби β -меркаптоетанолу, який відновлює залишки цистеїну. Цей підхід використовують, якщо треба визначити молекулярну масу всіх поліпептидів у складі білкової суміші. Для цього пробу обробляють β -меркаптоетанолом і ДДС-Na, і після цього проводять електрофорез у денатуруючих умовах.

Виявлення білків у гелі після електрофорезу

Після завершення електрофорезу білкові смуги у гелі можна виявити забарвленням за допомогою кумасі. Кумасі – це складна органічна молекула з кількома ароматичними кільцями та зарядженими групами (рис. 7). Сульфогрупа барвника взаємодіє з позитивно зарядженими амінокислотними залишками білка. Забарвлення проводять у кислому середовищі. Цей метод дозволяє виявляти у гелі 0,3-1 мкг протеїну в одній смугі.

Останнім часом набув розповсюдження метод забарвлення білка із застосуванням нітрату срібла. Цей метод забезпечує набагато вищу чутливість (2–5 нг протеїну в одній смугі), але займає більше часу та вимагає більших зусиль від експериментатора.

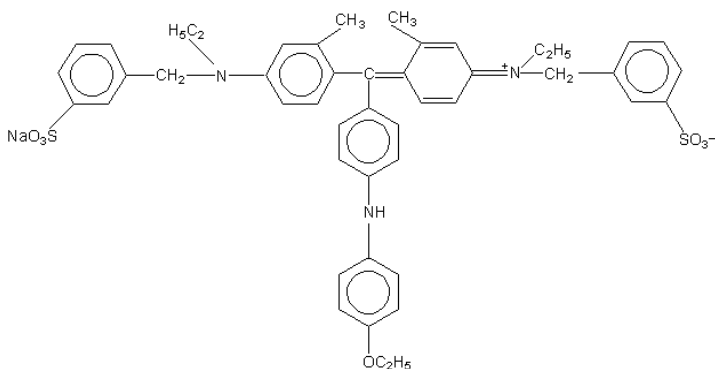


Рис. 7. Структура молекули кумасі G-250

Крім того, за останнє десятиліття розроблено кілька флуоресцентних барвників (наприклад, SYPRO Orange фірми Bio-Rad), застосування яких при мінімумі витраченого часу та маніпуляцій забезпечує майже таку ж високу чутливість, як при використанні нітрату срібла. Проте ці барвники дорогі для повсякденного застосування.

Універсальним методом ідентифікації певних білків після електрофорезу також є застосування специфічних антитіл у комбінації з методом імуноблотингу. Проте отримання антитіл – складне та дороге завдання.

При проведенні електрофорезу в нативних умовах існує також можливість виявити окремі білки у гелі за їхньою ферментативною активністю з використанням специфічних кольорових реакцій. Для цього гель після електрофорезу витримують у розчині для фарбування. Цей розчин містить субстрат для певного ферменту та допоміжні речовини, що забезпечує появу специфічного забарвлення в місцях наявності ізоферментів або, навпаки, на фоні забарвленого гелю спостерігаються незабарвлені смуги ізоферментів. Такий підхід застосовується, зокрема, для виявлення аскорбатпероксидази, гваяколпероксидази, каталази, естерази та багатьох інших ферментів. З'ясовано, що ізоферментний спектр може змінюватись залежно від фізіологічного стану організму протягом онтогенезу та під впливом факторів зовнішнього середовища. Наприклад, за дії підвищених температур у листках *Arabidopsis thaliana* відбувається індукція додаткової ізоформи аскорбатпероксидази, а ізоферментні спектри каталази у цієї рослини змінюються залежно від віку рослин. Крім досліджень з молекулярної фізіології та генетики онтогенезу, різниця в ізоферментних спектрах використовується при вивченні спорідненості окремих видів, популяцій, сортів рослин або порід тварин.

Робота 29. Електрофорез білків у денатуруючому ПААГ

Мета: ознайомитися з методикою проведення електрофорезу у поліакриламідному гелі.

Обладнання та реактиви: вага, рН-метр, термоблок, блок живлення, прилад для електрофорезу з вертикальним розташуванням пластин, фотоапарат, склянки, колби, мірні

пробірки, мірні циліндри, шпателі, кліпси, автоматичні мікропіпетки з наконечниками, ванночка для фарбування гелю, сухі трис, гліцин, акриламід, бісакриламід, АПС, ДДС-Na, дітіотрейтол, кумасі G-250, бідистильована вода, гліцерол, концентрована соляна кислота, ізопропанол, TEMED, льодова оцтова кислота, вазелін, білковий екстракт, отриманий у роботі 15.

Хід роботи

1. Приготуйте розчини:

- 1 л 5× електродного трис-гліцинового буфера. Для цього розчиніть 15,1 г трису та 72 г гліцину у 700 мл води, доведіть бідистильованою водою до 1000 мл. Перед використанням цей розчин розведіть у 5 разів;

- 50 мл 0,5 М трис-HCl, рН 6,8 (4× буфер для концентруючого гелю). Для цього розчиніть 3,25 г трису в 20 мл бідистильованої води та доведіть рН до 6,8. Доведіть загальний об'єм розчину до 50 мл;

- 100 мл 1,5 М трис-HCl, рН 8,8 (4× буфер для розділювального гелю). Для цього розчиніть 18,2 г трису в 60 мл води та доведіть рН до 8,8. Доведіть загальний об'єм до 100 мл;

- 100 мл 30 % АКА-БІС (30% акриламід, 0,8% N,N-метиленбісакриламід). Для приготування розчину змішайте 30 г акриламід та 0,8 г бісакриламід та додайте води до загального об'єму 100 мл. **УВАГА. ДУЖЕ ТОКСИЧНО! ПРАЦЮЙТЕ ПІД ВИТЯЖНОЮ ШАФОЮ У РУКАВИЦЯХ І МАСЦІ;**

- 200 мл фіксуючого розчину. Для цього змішайте 130 мл води, 50 мл ізопропанолу та 20 мл льодової оцтової кислоти;

- 200 мл розчину кумасі для забарвлення. Для цього змішайте 180 мл води, 20 мл льодової оцтової кислоти та 12 мг кумасі G-250;

- 600 мл 7%-ої оцтової кислоти;
- 20 мл 20% ДДС- Na;
- 10 мл 6× ДДС-буфера для нанесення проб. Для цього змішайте 7 мл 0,5 М трис-НСІ, рН 6,8, 3,6 мл гліцеролу, 1 г ДДС-Na, 0,93 г ДТТ, 1,2 мг бромфенолового синього. Доведіть водою до 10 мл;
- 3 мл 10% АПС.

Примітка: Розчини можна приготувати заздалегідь і зберігати у холодильнику. Розчин 10 % АПС та 6× ДДС-буфер для нанесення проб розлийте на аликвоти по 0,5 мл та зберігайте при мінус 20 °С.

2. Два електрофорезні стекла – з вушками та без вушок – протріть етанолом. При цьому не можна тримати скло за вушка, оскільки вони дуже легко ламаються.

3. На електрофорезне скло без вушок покладіть 3 спейсери – один знизу, два по боках перпендикулярно до нижнього, так, щоб бокові спейсери щільно прилягали до нижнього. Зверху покладіть скло з вушками. Переконайтеся, що між спейсерами немає щілин (оскільки це призведе до протікання гелю в цих місцях) і стисніть стекла між собою кліпсами.

4. Приготуйте 5 мл 2 % агарози на воді.

5. Залийте за допомогою автоматичної мікропіпетки невелику кількість агарози по зовнішньому краю скла вздовж спейсерів для того, щоб досягнути герметизації форми.

6. Використовуючи маточні розчини, змішайте в колбочці 1,9 мл 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 2,5 мл 30% АКА-БІС, 0,8 мл 20% ДДС–Na та 3,1 мл бідистильованої води (див. додаток В, таблиця 4). Дегазуйте суміш у вакуумі протягом 5 хв. Після цього для ініціації полімеризації гелю додайте 50 мкл 10% АПС та 10 мкл ТЕМЕД, обережно перемішайте та зразу ж залийте отриманий розчин у зібрану форму, заповнивши простір між стеклами на 2/3 по висоті. ПРОКОНТРОЛЮЙТЕ, ЧИ НЕ ПРОТІКАЄ ГЕЛЬ.

7. Користуючись автоматичною мікропіпеткою, обережно нашаруйте зверху 2–3 мм води. (Це забезпечує полімерізацію гелю за відсутності повітря). При цьому стекла тримайте під кутом, щоб вода різко не зайшла у гелевий розчин, а залишилася на його поверхні. Коли гель заполімеризується, воду обережно злийте.

8. Приготуйте концентруючий гель. Для цього змішайте 3 мл води, 650 мкл акриламід, 1,25 мл 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8), 25 мкл 20% ДДС–Na, 45 мкл 10% АПС, 5 мкл ТЕМЕД. Залийте концентруючий гель у форму зверху на розділювальний гель і зразу вставте гребінку.

9. Після того, як гель заполімеризується, витягніть гребінку, обережно за допомогою шпателя та фільтрувального паперу зніміть залишки поліакриламід з скла, промийте лунки дистильованою водою. Витягніть нижній спейсер.

10. Змастіть скло з вушками вазеліном. Вставте стекла в електрофорезний прилад, притисніть і закріпіть їх там.

11. Змішайте 995 мл 1× трис-гліцинового буфера та 5 мл 20% ДДС–Na, обережно залийте у верхній та нижній резервуар, не допускаючи появи піни, яка легко утворюється через наявність у розчині ДДС-Na. **ПРОКОНТРОЛЮЙТЕ, ЧИ НЕ ВИТІКАЄ БУФЕР ІЗ ВЕРХНЬОГО РЕЗЕРВУАРУ!**

Примітка: наявність ДДС-Na у гелі та електрофорезному буфері необхідна для забезпечення денатурації білків під час електрофорезу.

12. Білкові екстракти перенесіть із морозильної камери на лід. Для контролю використовуйте 0,1%-й розчин альбуміну.

13. Підготуйте проби для нанесення на гель. Для цього безпосередньо на льоду до 15 мкл білкового екстракту додайте 3 мкл 6× ДДС-буфера для нанесення проб, перемішайте та прогрійте у термоблоці протягом 3–5 хв при 80–85 °С для інактивації протеаз, які можуть міститися у пробі. Після прогрівання проб зразу ж нанесіть їх на гель.

Примітка: не залишайте проби при кімнатній температурі за наявності 6× ДДС-буфера, оскільки за цієї температури активуються протеази, які можуть пошкоджувати білки.

14. Електрофорез проводьте при 100–120 V. Вимкніть прилад, коли барвник буде на відстані 1 см від нижнього краю гелю.

15. Обережно від'єднайте форму з гелем від приладу та помістіть її у ванночку. Витягніть бокові спейсери. Щоб роз'єднати стекла одне від одного, введіть шпатель між стеклами у вільний від гелю простір та обережно повертайте його, не докладаючи великих зусиль, щоб не зламати стекла. Слідкуйте за тим, на якому склі знаходиться гель. Візьміть гель за два нижні кінці, обережно перекладіть його у ванночку з фіксуючим розчином та проінкубуйте протягом 30 хв.

16. Злийте фіксуючий розчин і залийте гель для забарвлення розчином кумасі. Залишіть на 2 години при помірному перемішуванні.

17. Злийте розчин для фарбування та відмийте гель 7%-ою оцтовою кислотою, змінюючи розчин кожну годину. Промивку продовжуйте до тих пір, доки фон не стане прозорим, а сині смуги білка будуть чітко вирізнятися.

18. Сфотографуйте гель.

Робота 30. Вивчення ізоферментних спектрів каталази у різних видів рослин

Мета роботи: порівняти ізоферментні спектри каталази у різних видів рослин.

Обладнання та реактиви: вага, блок живлення, прилад для вертикального електрофорезу, центрифуга, шейкер, фотоапарат, склянки, колби, мірні пробірки, мірні циліндри, шпателі, центрифужні пробірки, охолоджені ступки з товчачиками, кліпси, лід, вазелін, сухі хлорид заліза тривалентного, гексацианоферрат калію, бідистильована вода, гліцерол, 1× трис-гліциновий буфер, 30% АКА-БІС, 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8), 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 10 % АПС, ТЕМЕД, 0,02 %-й розчин бромфенолового синього в екстракційному буфері, 30%-й пероксид водню, 1 М дітіотрейтол, реактив Бредфорда, рослинний матеріал – тютюн, пшениця, кукурудза, арабідопсис.

Хід роботи

1. Приготуйте розчини, необхідні для роботи:

- 10 мл буфера для отримання білкового екстракту, який містить 0,1 М трис-НСІ (рН 6,8), 20% гліцерол, 30 мМ дітіотрейтол. Готовий буфер тримайте на льоду.

- 100 мл 2%-й FeCl_3 ;

- 100 мл 2%-й $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$;

- 300 мл 0,01%-й H_2O_2 .

2. Підготуйте електрофорезний прилад і зберіть стекла, як описано в роботі 29.

3. Приготуйте 7,5%-й розділювальний нативний ПААГ. Для цього змішайте в колбочці 4,5 мл бідистильованої води, 2,5 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 2,5 мл 30% АКА-БІС, 750 мг гліцеролу. Дегазуйте розчин, додайте 50 мкл 10% АПС і 10 мкл ТЕМЕД, перемішайте та залийте гель у форму (технологія приготування та заливки гелю детально описана в роботі 29).

4. Приготуйте концентруючий гель, змішавши для цього 3 мл води, 1,25 мл 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8), 650 мкл 30% АКА-БІС, 500 мг гліцеролу. Додайте 45 мкл 10% АПС, 5 мкл ТЕМЕД, перемішайте та залийте концентруючий гель у форму, вставте гребінку.

5. Вставте стекла з гелем у прилад для електрофорезу, залийте 1×трис-гліциновий буфер.

6. Білковий екстракт готуйте на холоді. Для цього заздалегідь охолодіть ступки, товчачики, екстракційний буфер. Наважку рослинного матеріалу 100 мг залийте 200 мкл буфера та ретельно розітріть у ступці.

7. Перенесіть вміст у мікроцентрифужні пробірки та залиште інкубуватися на льоду протягом 5–7 хв.

8. Відцентрифугуйте мікропробірки протягом 20 хв при 15 000 g (13 000 об/хв, центрифуга Biofuge pico). Перенесіть супернатант у чисту пробірку.

9. Виміряйте кількість білка у пробах (див. роботу 18). До нанесення на гель зберігайте білковий екстракт на льоду.

10. Для кожної проби нанесіть на гель однакову кількість білка. Об'єм проби має бути не більше 20 мкл. Для спостереження за проходженням електрофорезу у порожню лунку на гелі нанесіть 0,02%-й розчин бромфенолового синього в екстракційному буфері.

11. Електрофорез проводьте на холоді при напрузі 100 В протягом 6–8 годин, доки барвник не дійде до кінця гелю.

12. Перед закінченням електрофорезу змішайте по 120 мл 2%-го FeCl_3 та 2%-го $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Розчин нестійкий, тому його готують не більш, ніж за півгодини до використання.

13. Після проходження електрофорезу розберіть прилад і витягніть гель (див. роботу 29).

14. Для забарвлення гелю проінкубуйте його 5 хв у 0,01% H_2O_2 . Промийте дистильованою водою та занурте на 2–5 хв у розчин суміші 2%-го FeCl_3 та 2%-го $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Спостерігайте появу жовтуватих смуг на темно-зеленому фоні.

15. Зупиніть реакцію, промивши гель водою.

16. Сфотографуйте гель.

17. За необхідності зберігайте гель у 7%-му розчині оцтової кислоти.

Робота 31. Виявлення ізоформ аскорбатпероксидази методом електрофорезу у нативному ПААГ

Мета: визначити відміності в ізоферментному складі аскорбатпероксидази у рослин *Arabidopsis thaliana*, котрі культивувалися за різних умов.

Обладнання та реактиви: вага, настільна центрифуга для мікропробірок, спектрофотометр, прилад для вертикального електрофорезу, блок живлення, шейкер, фотоапарат, кліпси, ступки та товчачики, стакани, мірні пробірки, циліндри, мікроцентрифужні пробірки, автоматичні піпетки з наконечниками, кварцові кювети, рідкий азот, лід, нітросиній

тетразолій, буфер для отримання білкового екстракту (робота 16), 0,5 М ЕДТА, 1× трис-гліциновий М трис-НСІ (рН 7,0), 30% АКА-БІС, 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8), 1 М натрій-фосфатний буфер (рН 7,0) 1 М натрій-фосфатний буфер (рН 7,8), 1 М аскорбінова кислота, гліцерол, 10% АПС, ТЕМЕД, 0,02%-й розчин бромфенолового синього в екстракційному буфері, 30%-й пероксид водню, реактив Бредфорда, бідистильована вода, рослини *Arabidopsis thaliana*, які росли за різних температурних умов (20 °С та 33 °С).

Хід роботи

1. Підготуйте електрофорезний прилад і зберіть стекла, як описано в роботі 21.

2. Приготуйте 12 % розділювальний нативний ПААГ. Для цього змішайте в колбочці 1,9 мл 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 3 мл 30% АКА-БІС, 2,1 мл бідистильованої води та 750 мг гліцеролу. Дегазуйте розчин, додайте 75 мкл 10% АПС і 3 мкл ТЕМЕД, перемішайте та залийте гель у форму (технологія приготування та заливки гелю детально описані в роботі 29).

3. Приготуйте концентруючий гель, змішавши для цього 3 мл води, 650 мкл 30% АКА-БІС, 1,25 мл 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8) та 500 мг гліцеролу. Додайте 45 мкл 10% АПС, 5 мкл ТЕМЕД, перемішайте та залийте концентруючий гель у форму зверху на розділювальний гель і зразу ж вставте гребінку.

Примітка: На відміну від роботи 29, ДДС-Na у розділ розділювальний та концентруючий гелі не додається, оскільки для подальшого визначення ферментної активності у гелі необхідне збереження нативної конформації білків. Для стабілізації нативної структури білків у гелі додають гліцерол.

2. Вставте стекла з гелем у прилад для електрофорезу, залийте 1×трис-гліциновий буфер, попередньо додавши до нього аскорбінової кислоти до кінцевої концентрації 2 мМ. Перенесіть прилад у холодну камеру.

3. Увімкніть прилад для попереднього електрофорезу протягом 30 хв при напрузі 45 В.

Примітка: попередній електрофорез проводиться для того, щоб аскорбінова кислота під дією електричного поля перейшла з електродного буфера в гель, де її наявність необхідна для збереження активності APX під час електрофорезу. Додавання аскорбінової кислоти безпосередньо у гель неможливе, оскільки це буде перешкоджати полімеризації.

4. Приготуйте екстракт нативних білків. Для цього візьміть по 100 мг рослинного матеріалу на пробу, заморозьте рідким азотом, розітріть і додайте 100 мкл буфера для екстракції.

5. Перенесіть гомогенат у чисту мікроцентрифужну пробірку та відцентrifугуйте на холоді 20 хв при 15 000 g (13 000 об/хв, центрифуга Biofuge pico).

6. Перенесіть супернатант у чисту мікропробірку.

7. Виміряйте кількість білка у пробах (див. роботу 18).

8. Для кожної проби нанесіть на гель однакову кількість білка. Об'єм проби має бути не більше 20 мкл. Для спостереження за проходженням електрофорезу у порожню лунку на гелі нанесіть 0,02%-й розчин бромфенолового синього в екстракційному буфері.

9. Електрофорез проводьте при напрузі 100 В протягом 1,5–2 години, поки лідуючий барвник не дійде до кінця гелю.

10. Під час проходження електрофорезу приготуйте розчини, необхідні для виявлення ізоферментів у гелі після електрофорезу:

- 1 л 50 мМ натрій-фосфатного буфера (рН 7,0);
- 600 мл розчину I (50 мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,0), 4 мМ аскорбат);
- 200 мл розчину II (50 мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,0), 4 мМ аскорбат, 2 мМ H₂O₂);

- 200 мл розчину III (50 мМ натрій-фосфатний буфер (рН 7,8), 28 мМ ТЕМЕД, 2,45 мМ нітросиній тетразолій).

11. Після проходження електрофорезу розберіть прилад, витягніть гель (див. роботу 29) та помістіть його у ванночку з розчином I.

12. Для виявлення ізоформ аскорбатпероксидази проінкубуйте гель 3 рази по 5 хв у розчині I та 10 хв у розчині II. Промийте гель 1 хв у 50 мМ натрій-фосфатному буфері (рН 7,0). Після цього залийте гель розчином III та інкубуйте його до появи білих смуг на блакитному фоні (3–4 хв). Для зупинки реакції перенесіть гель у дистильовану воду.

13. Порівняйте ізоформи аскорбатпероксидази рослин, які культивувалися за різних умов.

14. Сфотографуйте гель.

Робота 32. Вивчення ізоферментного спектра гваяколпероксидази

Мета роботи: вивчити ізоферментний спектр гваяколпероксидази різних видів рослин методом електрофорезу у нативному ПААГ.

Обладнання та реактиви: вага, центрифуга, блок живлення, прилад для вертикального електрофорезу, шейкер, фотоапарат, кліпси, колби, склянки, мірні пробірки, мірні циліндри, шпателі, автоматичні піпетки з наконечниками, центрифужні пробірки, вазелін, лід, суха сахароза, бідистильована вода, 1×трис-гліциновий буфер, 30%_АКА-БІС, 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8), 10% АПС, ТЕМЕД, 30 %-й пероксид водню, 1 М аскорбінова кислота, розчин 5 мМ бензидину у натрій-ацетатному буфері (рН 5,4), реактив Бредфорда, 0,02%-й розчин бромфенолового синього в екстракційному буфері, рослинний матеріал – тютюн, пшениця, кукурудза.

Хід роботи

1. Приготуйте розчини, необхідні для роботи:
 - 10 мл буфера для виділення білка, який містить 0,1 М трис-НСІ (рН 6,8), 15%-ну сахарозу, 1мМ аскорбінову кислоту;
 - 0,002% H_2O_2 .
2. Підготуйте електрофорезний прилад і зберіть стекла, як описано в роботі 29.
3. Приготуйте 7,5%-й розділювальний нативний ПААГ. Для цього змішайте в колбочці 5,0 мл бідистильованої води, 2,5 мл 1,5 М трис-НСІ (рН 8,8), 2,5 мл 30%_АКА-БІС. Дегазуйте розчин, додайте 50 мкл 10 % АПС та 10 мкл ТЕМЕД, перемішайте та залийте гель у форму (технологія приготування та заливки гелю детально описана в роботі 29).
4. Приготуйте концентруючий гель, змішавши для цього 3 мл води, 650 мкл 30% АКА-БІС, 1,25 мл 0,5 М трис-НСІ (рН 6,8). Додайте 45 мкл 10% АПС, 5 мкл ТЕМЕД, перемішайте та залийте концентруючий гель у форму зверху на розділювальний гель і зразу ж вставте гребінку.
5. Вставте стекла з гелем у прилад для електрофорезу, залийте 1×трис-гліциновий буфер.
6. Для приготування білкового екстракту 250 мг рослинного матеріалу залийте 0,5 мл буфера для виділення білка та ретельно розітріть у ступці. Додайте ще 1 мл буфера для екстракції та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 10 хв. Перенесіть у пробірки для центрифугування та відцентрифугуйте 20 хв при 15 000 g (13 000 об/хв, центрифуга Biofuge pico). Після цього перенесіть супернатант у чисту пробірку та поставте на лід.
7. Виміряйте кількість білка у пробах (див. роботу 18).
8. Для кожної проби нанесіть на гель однакову кількість білка. Об'єм проби має бути не більше 20 мкл. Для спостереження за проходженням електрофорезу у порожню лунку на гелі нанесіть 0,02% розчин бромфенолового синього в екстракційному буфері.

9. Електрофорез проводьте при напрузі 100 В протягом 2-3 годин, доки лідуєчий барвник не дійде до кінця гелю.

10. Після проходження електрофорезу розберіть прилад, витягніть гель (див. роботу 29), помістіть його у ванночку та інкубуйте гель протягом 30 хв у 5 мМ розчині бензидину при легкому помішуванні на шейкері. Промийте гель дистильованою водою та залийте 0,002%-ним розчином H_2O_2 , інкубуйте до появи смуг. Зупиніть реакцію перенесенням гелю у дистильовану воду.

11. Ізоформи гваяколпероксидази проявляються на гелі у вигляді темних смуг. Порівняйте кількість і розташування ізоформ у гелі для різних рослин. Сфотографуйте гель.

Запитання та завдання для самоконтролю

1. Для чого використовується електрофорез білків?
2. Що таке диск-електрофорез?
3. Що таке розділювальний та концентруючий гелі? Чим вони відрізняються? Для чого використовуються?
4. Як проводиться електрофорез у денатуруючих умовах?
5. Що таке електрофорез у нативних умовах? Для чого він використовується?
6. Як після електрофорезу можна виявити білок у гелі?
7. На якому принципі ґрунтується визначення активності білка у гелі?

ДОДАТКИ

Додаток А

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРАЦІ В ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні положення

1. Студенти повинні дотримуватися правил техніки безпеки і запобігати випадки порушенням цих правил іншими. Забороняється допускати студентів до виконання лабораторних робіт без вивчення даної інструкції та додатків до неї.

2. На початку кожного семестру студенти проходять інструктаж із техніки безпеки. Проведення інструктажу задокументовується підписом у лабораторному журналі з техніки безпеки.

3. Лабораторні заняття проводяться у чітко встановлені години, визначені розкладом.

Вимоги безпеки перед початком роботи

1. Лабораторія має бути у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.

2. Перед початком роботи потрібно:

- оглянути й упорядкувати робоче місце;
- перевірити витяжну систему;
- перевірити правильність під'єднання устаткування до електромережі;
- перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
- переконатися в наявності захисного заземлення приладів.

3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання. Працівник зобов'язаний повідомити керівнику про виявлені пошкодження.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Під час роботи у лабораторії необхідно дотримуватися таких правил:

- використовувати захисний одяг (лабораторний бавовняний халат, за необхідності – гумові рукавички й окуляри або захисну маску; при роботі з дрібнодисперсними речовинами потрібно вдягати респіраторні маски);
- двері під час роботи мають бути зачинені;
- при роботі з вибуховими та легкозаймистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи і пилу;
- при роботі з леткими речовинами необхідно користуватися витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри забороняється:

- працювати без нагляду викладача або лаборанта;
- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- набирати реактиви у піпетки ротом;
- викидати в раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальничками тощо);
- переносити обладнання без дозволу зав кафедрою або зав. лабораторією;

- користуватися зіпсованими електроприладами;
 - самостійно проводити ремонт розеток, вимикачів, запобіжників;
 - користуватися витяжними шафами з розбитим склом або непрацюючою вентиляцією;
 - зберігати реактиви у посуді без етикеток.
- По закінченні роботи треба мити руки.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути зорієнтована на такі принципи:

1. Робота зі шкідливими хімічними речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.
2. Використання токсичних і потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні.
3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.
4. У кожній лабораторії мають бути списки небезпечних речовин.

При роботі з хімічними речовинами кожен працівник зобов'язаний ознайомитися з інформацією про небезпечні особливості цих речовин, особливо про їх токсичність та канцерогенність.

При роботі з горючими та вибухонебезпечними речовинами заборонено запалювати вогонь у лабораторії. Такі речовини не можна піддавати дії прямого сонячного світла. Проводити роботу з вибухонебезпечними речовинами в лабораторії дозволяється лише у витяжній шафі.

Зберігання горючих рідин дозволяється лише в металічних шафах або в мінімальній кількості у витяжній шафі. При переливанні цих рідин необхідно користуватися

захисними окулярами або застосовувати для переливання піпетки. Пляшки з горючими речовинами мають бути підписані та транспортуватися лише у захисних ємностях (відрах, металевих боксах тощо).

При роботі з їдкими речовинами необхідно застосовувати захисні окуляри. Розпилювання токсичних канцерогенних, мутагенних, тератогенних речовин у лабораторії заборонене. Усі ці речовини мають зберігатися лише у відповідно підписаних ємностях. Збирання залишків небезпечних речовин та їхня утилізація має відбуватися з урахуванням техніки безпеки.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади й апаратуру;
- виходячи останнім, зачинити вікна (квартирки), вимкнути світло, газ, перевірити чи вимкнені всі електроприлади та закриті крани, зачинити приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журналі.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

1. При порушеннях у роботі приладів необхідно проінформувати працівника, який відповідає за даний прилад. При порушеннях у роботі вентиляційної системи, водопроводу, електрики та газопостачання мають бути проінформовані відповідні підрозділи університету.

2. При випадковому розливанні вибухонебезпечних і горючих рідин місця розливу потрібно засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою та винести у спеціально відведене місце.

3. Працівники мають уникати дій, які можуть призвести до пожежі. Газові горілки та спиртівки заборонено залишати без нагляду. Паління заборонено на всій території університету.

4. При виникненні пожежі необхідно перекрити струм і газ у лабораторії та організувати гасіння пожежі.

5. У випадку загорання горючої рідини необхідно погасити всі горілки, прикрити полум'я азбестовим рушником чи засипати його піском, або скористатися вогнегасником з вуглекислим газом. Розчинні у воді вогненебезпечні речовини, такі як етанол, ацетон та інші, можна гасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад, ефір, бензол, бензин), то воду використовувати для гасіння пожежі не можна, оскільки вогонь не тільки не буде ліквідований, але може навіть збільшитися. У цьому разі полум'я потрібно гасити піском і використовувати вогнегасник.

6. Кожен працівник зобов'язаний знати, де знаходяться вогнегасники, ящики з піском і ковдри для гасіння вогню і бути ознайомленим із планом евакуації на випадок пожежі. Маленькі лабораторні пожежі мають бути погашені наявними протипожежними засобами (пісок, ковдри, вогнегасники).

7. При виникненні великої пожежі, яку не вдається загасити з вогнегасника, потрібно організувати евакуацію людей з приміщення, зачинити двері в лабораторію і терміново викликати пожежників за тел. 101 та повідомити адресу, поверх і номер кімнати. Необхідно також організувати евакуацію персоналу з будівлі. При цьому мають бути вжиті заходи щодо перекриття газопостачання до будинку.

Надання першої медичної допомоги

У випадку ураження людини струмом насамперед потрібно вимкнути рубильники та викликати «Швидку допомогу» за номером 103.

При легких термічних опіках шкіру належить промити етанолом, а потім змастити гліцеролом або вазеліном. При сильніших опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та етанолом необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідиновою емульсією).

При опіках міцними кислотами потрібно промити обпалене місце великою кількістю води протягом 10 хв, потім – 3 %-м розчином соди.

При опіках міцними лугами шкіру треба промити великою кількістю води, а потім нейтралізувати 1 %-м розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При отруєнні хімікатами потрібно терміново викликати лікаря або відправити потерпілого в найближчий лікарський заклад. Дуже важливо визначити, якою речовиною сталося отруєння. Перша допомога при будь-якому отруєнні полягає у швидкому виведенні отрути з організму, а якщо це неможливо, то у знешкодженні її в організмі. При попаданні отрути в організм через рот необхідно викликати блювання. Проте це не можна робити, якщо потерпілий перебуває у несвідомому або напівсвідомому стані, а також при різкому порушенні кровообігу (колапс). Найпростіший спосіб викликати блювання – ввести пальці глибоко в рот. Щоб вивести отруту зі шлунку, потрібно дати випити велику кількість (5–8 склянок) теплої (30–35 °C) води, а після цього знову викликати блювання. Таке промивання шлунку

необхідно повторити кілька разів. Якщо отрута відома, шлунок промивають чистою водою, або розчинами речовин, які нейтралізують отруту. При отруєнні кислотами для промивання шлунку застосовують воду (використання розчину соди не допускається). При отруєнні лугами промивку проводять 2%-ою оцтовою або лимонною кислотою. При отруєнні ртуттю або свинцем для промивання використовують молоко.

При отруєнні парами постраждалого необхідно вивести на свіже повітря. При послабленні дихання та нестачі кисню – застосовувати штучне дихання і викликати лікаря.

При попаданні хімікатів у очі їх необхідно негайно промити великою кількістю води.

При порізах у разі необхідності усунути з рани уламки скла або інших матеріалів, промити рану, краї рани продезинфікувати 3%-м спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах – накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити постраждалого у лікарню.

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕБЕЗПЕЧНИХ РЕЧОВИН

Легкозаймисті речовини. Ацетон, бензин, гептан, дихлоретан, етанол, метанол, ізопропанол, бутанол, ефір, β-меркаптоетанол, N,N,N',N'-тетраметилетилендіамід (ТЕМЕД), хлороформ.

Небезпека для людини та довкілля. Ці речовини легко загораються, пари в атмосфері можуть бути вибухонебезпечними. Вдихання парів можуть викликати головний біль, порушення координації рухів. При довгому контакті можливе незворотне порушення здоров'я.

Засоби захисту та правила поведінки. Працювати тільки у витяжній шафі, поодаль від відкритого вогню, електроприлади мають бути заземлені. Не зливати в каналізацію. Великі кількості (більше, ніж 1 л) зберігати у спеціальній запобіжній шафі. Для захисту очей потрібно працювати в окулярах з боковим захистом. Уникати контакту зі шкірою. Не вдихати пари. У лабораторії не їсти, не пити, не курити. Не зберігати продукти харчування.

Правила поведінки в аварійних ситуаціях. При випадковому розливанні речовин повідомити працівників та провести їхню евакуацію з даної території, прибрати розлиті речовини, за необхідності застосовуючи протигаз, гумові рукавиці та гумові чоботи, добре провітрити приміщення.

При пожежі: маленьку пожежу загасити ковдрою, якщо це неможливо, то використовувати вогнегасник. НЕ ГАСИТИ ВОДОЮ, за винятком речовин, які змішуються з водою (етанол, ізопропанол, меркаптоетанол, метанол, ТЕМЕД). При гасінні пожежі використовувати спецодяг: протигаз (оскільки вивільняються шкідливі пари), захисний одяг. Забруднений одяг і взуття ліквідувати.

При можливому отруєнні терміново звернутися до лікаря.

Додаток В

ПРИГОТУВАННЯ БУФЕРІВ І РОЗЧИНІВ

При приготуванні буферів і розчинів необхідно дотримуватися таких правил:

- використовувати найчистіші реактиви (насамперед з позначкою ЧДА – чистий для аналізу, ХЧ – хімічно чистий або ОСЧ – особливо чистий);
- усі розчини готуються на бідистильованій або деіонізованій воді;
- за можливості розчини необхідно автоклавувати або стерилізувати фільтруванням через 0,22 мкм фільтр.

Таблиця 1

Приготування робочих розчинів

Розчин	Методика приготування	Примітки
1 М трис pH = 7,4 pH = 7,6 pH = 8,0	Розчиніть 121,1 г трису в 8000 мл води. Доведіть pH до потрібного значення додаванням конц. HCl. Кількість конц. HCl (мл): 70 60 42 Перед остаточним доведенням pH почекайте, доки розчин охолоне до кімнатної температури. Доведіть об'єм розчину до 1 л. Розлийте на порції та простерилізуйте автоклавуванням.	Якщо 1 М розчин трис має жовте забарвлення, його необхідно вилити. Деякі електроди дають неправильний pH розчину трис; у такому випадку їх необхідно замінити новими. На pH розчину трис сильно впливає температура

0,5 М Na- ЕДТА рН = 8,0	Додайте 186,1 г динатрієвої солі ЕДТА х 2Н₂О до 800 мл Н₂О. Інтенсивно перемішайте на магнітній мішалці. Доведіть рН до 8,0 за допомогою NaOH (~ 20 г NaOH). Розлийте на порції та простерилізуйте автоклавуванням.	Динатрієва сіль ЕДТА не розчиняється до тих пір, поки рН розчину не буде доведено додаванням NaOH приблизно до 8,0.
3 М ацетат натрію рН = 5,2	Розчиніть 408,1 г ацетату натрію х 3Н₂О в 800 мл Н₂О. Доведіть рН до 5,2 льодовою оцтовою кислотою. Доведіть об'єм до 1 л. Розлийте на порції та простерилізуйте автоклавуванням.	
5 М ацетат калію	До 60 мл 5М ацетату калію додайте 11,5 мл льод. оцтової кислоти та 28,5 мл Н₂О. Концентрація калію такого розчину складає 3 М, а концентрація ацетату 5 М.	

Таблиця 2

Приготування буферних розчинів

0,2 М натрій-ацетатний буфер, рН 3,6–5,8

рН при 18 °С	0,2 М ацетат натрію, мл	Оцтова кислота 0,2 М, мл
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,80
4,0	1,80	8,20
4,2	2,65	7,35
4,4	3,70	6,30
4,6	4,90	5,10
4,8	5,90	4,10
5,0	7,00	3,00
5,2	7,90	2,10
5,4	8,60	1,40
5,6	9,10	0,90
5,8	9,40	0,60

0,1М натрій-фосфатний буфер, рН 5,8-8,0

рН	0,2 М Na₂HPO₄, мл	0,2 М NaH₂PO₄, мл	H₂O, мл
5,8	8,0	92,0	До 200
6,0	12,3	87,7	» 200
6,2	18,5	81,5	» 200
6,4	26,5	73,5	» 200
6,6	37,5	62,5	» 200
6,8	49,0	51,0	» 200
7,0	61,0	39,0	» 200
7,2	72,0	28,0	» 200
7,4	81,0	19,0	» 200
7,6	87,0	13,0	» 200
7,8	91,5	8,5	» 200
8,0	94,7	5,3	» 200

50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 5,8-8,0

рН при 25 °С	0,2М К₂НРО₄ мл	0,2М КОН, мл	Н₂О, мл
5,8	5	0,36	До 20
6,0	5	0,56	» 20
6,2	5	0,81	» 20
6,4	5	1,16	» 20
6,6	5	1,64	» 20
6,8	5	2,24	» 20
7,0	5	2,91	» 20
7,2	5	3,47	» 20
7,4	5	3,91	» 20
7,6	5	4,24	» 20
7,8	5	4,45	» 20
8,0	5	4,61	» 20

Таблиця 3

Буфери для електрофорезу в агарозному гелі

Буфер	Робочий розчин (1×)	Приготування концентрованого розчину (1 л)
50× трис-ацетат (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат 0,001 М ЕДТА	242 г трису, 57,1 мл льод. оцтової кислоти, 100 мл 0,5 М ЕДТА, pH-8,0
10× трис-фосфат (ТРЕ)	0,08 М трис-фосфат 0,008 М ЕДТА	108 г трису, 15,5 мл 85 % фосфорної кислоти, (1,679 г/мл), 40 мл 0,5 М ЕДТА, pH-8,0
5× трис-борат (ТВЕ)	0,089 М трис-борат 0,089 М борна кислота 0,002 М ЕДТА	54 г трису, 27,5 г борної кислоти, 20 мл 0.5 М ЕДТА, pH-8,0

Таблиця 4

Приготування розділюючого поліакриламідного гелю

Маточний розчин, мл	Кінцева концентрація акриламіду в розділювальному гелі									
	5	6	7	7,5	8	9	10	12	13	15
30 % акриламід/ 0,8 %-й бісакриламід	2,50	3,00	3,50	3,75	4,00	4,50	5,00	6,00	6,50	7,50
4× (1,5 M) трис-HCl, рН 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H ₂ O	8,75	8,25	7,75	7,50	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75	3,75
10 %-й персульфат амонію	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
ТЕМЕД	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Додаток Г

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА ВЛАСТИВОСТІ РЕЧОВИН І РОЗЧИНІВ

Таблиця 1

Характеристики розчинів кислот і лугів, які надходять у продаж

Речовина	Молекулярна маса	Концентрація			Густина, г/см ³	Мл/л для приготування 1М розчину
		Моль / л	г / л	%, мас.		
Оцтова кислота, льод.	60,05	17,42	1046	99,5	1,05	57,5
Оцтова кислота	60,05	6,26	376	36	1,045	159,5
Мурашина кислота	46,02	23,47	1080	90	1,20	42,7
Соляна кислота	36,5	11,67	424	36	1,18	86,2
		2,88	105	10	1,05	
Азотна кислота	63,02	15,99	1008	71	1,42	62,5
		14,88	938	67	1,40	
		13,28	837	61	1,37	
Хлорна кислота	100,5	11,66	1172	70	1,67	85,8
		9,18	923	60	1,54	
Фосфорна кислота	97,9	14,8	1445	85	1,70	67,7
Сірчана кислота	98,1	18,0	1766	96	1,84	55,6
Гідроксид амонію	35,0	14,8	251	28	0,898	67,6
Гідроксид калію	56,1	13,5	757	50	1,52	74,1
		1,94	109	10	1,09	
Гідроксид натрію	40,0	19,1	763	50	1,53	52,4
		2,75	111	10	1,11	

Таблиця 2.

Концентрація та густина розчинів неорганічних сполук

Натрій ацетат, CH_3COONa

%	Моль/л	г/л	ρ
1	0,1223	10,03	1003,3
2	0,2458	20,16	1008,4
4	0,4966	40,74	1018,6
6	0,7525	61,73	1028,9
8	1,013	83,13	1039,2
10	1,279	104,9	1049,5
12	1,550	127,1	1059,8
14	1,826	149,8	1070,2
16	2,107	172,9	1080,7
18	2,394	196,4	1091,3
20	2,668	220,4	1102,1
22	2,984	244,8	1113,0
24	3,288	269,7	1124,0
26	3,597	295,1	1135,1
28	3,912	320,9	1146,2

Натрій фосфат двозаміщений, Na_2HPO_4

%	Моль/л	г/л	ρ
1	0,0711	10,09	1009
2	0,1437	20,40	1020
3	0,2179	30,93	1031
4	0,2939	41,72	1043
5	0,3716	52,75	1055
6	0,4510	64,02	1067

Натрій фосфат однозаміщений, NaH_2PO_4

%	г/л	ρ
1	10,04	1004,5
2	20,24	1012,0
4	41,08	1027,0
6	62,53	1042,2
8	84,60	1057,5
10	107,3	1073,0

Натрій хлорид, NaCl

%	Моль/л	г/л	ρ
1	0,1720	10,05	1005,3
2	0,3464	20,25	1012,5
4	0,7026	41,07	1026,8
6	1,0688	62,47	1041,3
8	1,445	84,47	1055,9
10	1,831	107,07	1070,7
12	2,228	130,2	1085,7
14	2,636	154,1	1100,9
16	3,055	178,5	1116,2
18	3,485	203,7	1131,9
20	3,927	229,5	1147,8
22	4,380	256,0	1164,0
24	4,846	283,2	1180,4
26	5,325	311,2	1197,2

Таблиця 3

Концентрація та густина розчинів неорганічних сполук

Скорочена назва	Повна назва	Формула	Робочий інтервал рН
MES	2-(N–морфоліно) етансульфонова кислота	$C_6H_{13}NO_4S$	5,5–6,7
PIPES	піперазин-N,N'–біс-2-етансульфонова кислота	$C_8H_{18}N_2O_6S_2$	6,1–7,5
MOPS	3-(N–орфоліно) пропансульфонова кислота	$C_7H_{15}NO_4S$	6,5–7,9
HEPES	N–(2-гідроксиетил)піперазин-N'–(2-етансульфонова кислота)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	6,8–8,2
TRIS	трис(гідроксиметил) амінометан	$C_4H_{11}NO_3$	7,0–9,0

Таблиця 4

Залежність рН буферних розчинів від температури

50 мМ трис-НСІ

4 °C	25 °C	37 °C
8,1	7,5	7,2
8,3	7,7	7,4
8,5	7,9	7,6
8,7	8,1	7,8
8,9	8,3	8,0
9,1	8,5	8,2

Різні органічні буфери

Буфер	pK / 20 °C	Δ pK / 10 °C
MES	6,15	-0,110
PIPES	6,80	-0,085
MOPS	7,20	-0,013
HEPES	7,55	-0,140
TRIS	8,30	-0,310

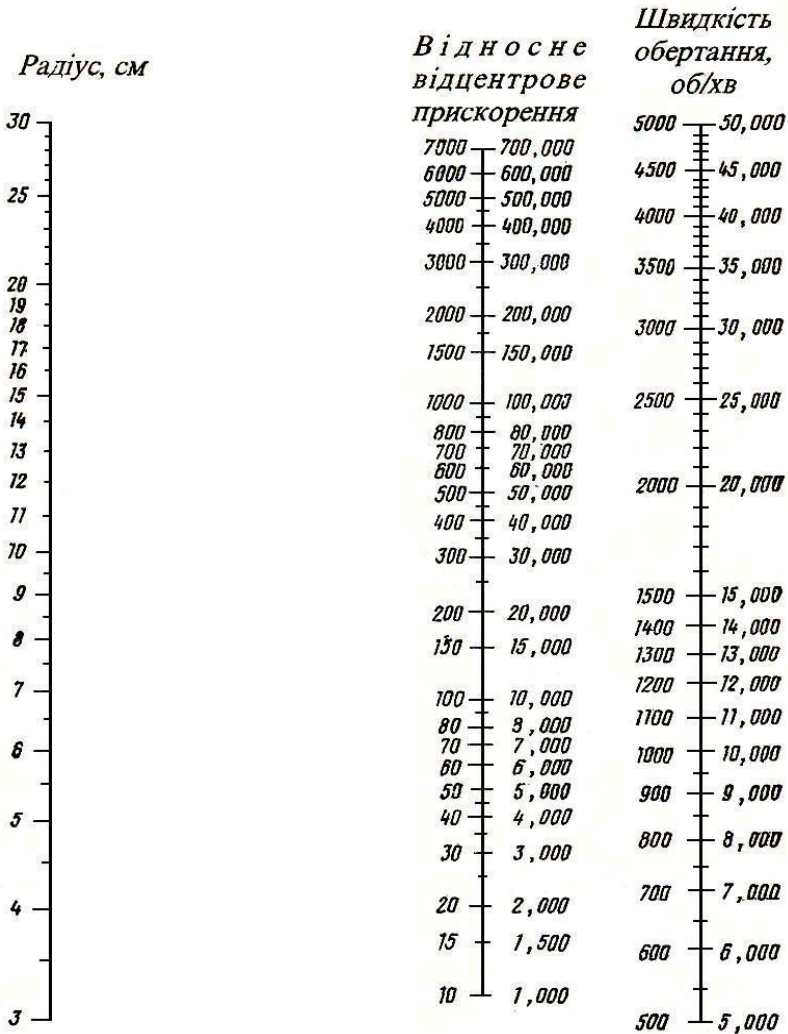
Таблиця 5

Густина розчинів сахарози та гліцеролу

Концентрація розчину, %									
5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Сахароза при 5 °С									
1,020	1,041	1,062	1,084	1,107	1,131	1,156	1,182	1,209	1,236
Сахароза при 20 °С									
1,018	1,038	1,059	1,081	1,103	1,127	1,151	1,177	1,203	1,230
Гліцерол при 5 °С									
1,012	1,025	1,038	1,051	1,065	1,078	1,092	1,105	1,119	1,133
Гліцерол при 20 °С									
1,010	1,022	1,035	1,047	1,060	1,073	1,086	1,099	1,113	1,126

Додаток Д

Номограма для визначення відцентрового прискорення у роторі центрифуги



СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Amako, K., Chen, G. X., & Asada, K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, 35(3), 497-504.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72, 248-254.
- Buzduga, I. M., Salamon, I., Volkov, R. A., & Panchuk, I. I. (2022). Rapid accumulation of cadmium and antioxidative response in tobacco leaves. *The Open Agriculture Journal*, 16(1).
- Dragovoz, I. V., Korzh, Y. V., Leonova, N. O., Iliash, V. M., & Avdeeva, L. V. (2015). Influence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7404 strain exometabolites on phenylalanine ammonia-lyase activity in winter wheat seedlings. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 87 (6), 136-141.
- Du, Z., & Bramlage, W. J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1566-1570.
- Gallagher, S. R., & Wiley, E. A. (Eds.). (2012). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. John Wiley & Sons.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., ... & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8695.

- Li, M., & Kim, C. (2022). Chloroplast ROS and stress signaling. *Plant Communications*, 3, 100264.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-75.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(10), 663-679.
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., & Schöffl, F. (2002). Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant physiology*, 129(2), 838-853.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-356.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *Lwt*, 150, 111932.
- Wilson, C. M. (1983). Staining of proteins on gels: Comparisons of dyes and procedures. *Methods in Enzymology*, 91, 236-247.
- Войцехівська, О.В., Белава, В.Н., & Смірнов, О.Є. (2020). Фізіологія вторинного метаболізму рослин. К.: АВЕГА, 47.
- Гааль, Э., Медьеши, Г., & Верецкеи, Л. (1982). Электрофорез в разделении биологических макромолекул. *М. Мур*, 446.
- Денисенко, Т. А., Вишникин, А. Б., & Цыганок, Л. П. (2015). Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу. *Аналитика и контроль*. 19(4), 373-380.

- Доліба, І. М., Волков, Р. А., & Панчук, І. І. (2010). Метод визначення каталазної активності у рослинному матеріалі. *Физиология и биохимия культурных растений*. 42 (6), 497-503.
- Еблер, Л. В., Цісак, А. О., Радаєва, І. М., & Казанцева, А. С. (2023). Аналіз фенольних сполук в екстракті з плодів горіха чорного (*Juglans nigra* L.) методом високоефективної рідинної хроматографії. *Фармацевтичний журнал*, 2023, 78 (2), 49-57.
- Кучеренко, М. Є., Бабенюк, Ю. Д., & Войціцький, В. М. (2001). Сучасні методи біохімічних досліджень. *Фітосоціоцентр*, 424.
- Мельничук, М. Д., Ліханов, А. Ф., Коваленко, Т. М., & Ключащенко, А. А. (2022). Вторинні метаболіти та їх роль у системах адаптації і захисту рослин. *Вінниця: ВНАУ. Видавець ТОВ «Друк»*, 192.
- Остерман, Л. А. (1981). Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование, *М. Наука*, 288.
- Остерман, Л. А. (1985). Хроматография белков и нуклеиновых кислот, *М. Наука*, 536.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	3
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	4
ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	6
Розчини та їх приготування	6
Робота 1. Розрахунки кількості речовини для приготування розчинів	11
Робота 2. Приготування розчинів заданої концентрації	12
Робота 3. Ознайомлення з властивостями буферних розчинів	16
Рефрактометричний метод аналізу	17
Робота 4. Визначення концентрації розчину за показником заломлення	17
Центрифугування	18
Робота 5. Виділення клітинних органел методом центрифугування	29
Робота 6. Приготування та фракціонування лінійного градієнта густини сахарози	31
Спектрометричний аналіз	32
Робота 7. Визначення оптимальної довжини хвилі для вимірювання на спектрофотометрі та фотоколориметр	34
Хроматографія	36
Робота 8. Гель-фільтрація на сефадексі	45
<i>Запитання та завдання для самоконтролю</i>	47
НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ МЕТАБОЛІТИ	49
Визначення вмісту низькомолекулярних метаболітів	49
Робота 9. Вимірювання вмісту вітаміну С у рослинах	56
Робота 10. Кількісне визначення фотосинтетичних пігментів	58
Робота 11. Визначення вмісту поліфенольних сполук	60

Робота 12. Визначення вмісту флавоноїдів	63
Робота 13. Визначення вмісту вільного проліну.....	64
Робота 14. Визначення вмісту тіобарбітурат-активних продуктів (ТБКАП).....	66
Робота 15. Визначення вмісту тіольних груп.....	67
Робота 16. Визначення внутрішньоклітинного вмісту активних форм кисню у суспензійній культурі <i>Arabidopsis thaliana</i> за дії теплового стресу	69
<i>Запитання та завдання для самоконтролю</i>	71
БІЛКИ: ЗАГАЛЬНІ ПІДХОДИ	72
Виділення білків	72
Робота 17. Виділення загального білка в присутності сечовини.....	72
Кількісне визначення вмісту білка	73
Робота 18. Визначення загального вмісту білка	74
Карбонільні групи у складі білків	78
Робота 19. Визначення вмісту карбонільних груп у білках.....	78
ФЕРМЕНТИ	81
Визначення активності ферментів	81
АФК та ферменти, залучені до стресової відповіді	82
Робота 20. Визначення активності аскорбат- та гваяколпероксидаз в одному екстракті спектрометричним методом.....	87
Робота 21. Визначення активності глутатіонредуктази	90
Робота 22. Визначення активності глутатіон-S-трансферази.....	91
Робота 23. Визначення активності дегідроаскорбат- редуктази.....	92
Робота 24. Визначення активності каталази.....	93

Робота 25. Визначення активності ліпоксигенази	95
Робота 26. Визначення активності поліфенолоксидази	96
Робота 27. Оцінка активності супероксиддисмутази спектральним методом	98
Робота 28. Визначення активності фенілаланінамонійліази спектральним методом	100
<i>Запитання та завдання для самоконтролю</i>	102
ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ БІЛКІВ	103
Робота 29. Електрофорез білків у денатуруючому ПААГ .	111
Робота 30. Вивчення ізоферментних спектрів каталази у різних видів рослин	115
Робота 31. Виявлення ізоформ аскорбатпероксидази методом електрофорезу у нативному ПААГ	117
Робота 32. Вивчення ізоферментного спектра гваяколпероксидази	120
<i>Запитання для самоконтролю</i>	122
ДОДАТКИ	123
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	146

Навчальне видання

Роман Анатолійович **Волков**, Ірина Ігорівна **Панчук**

БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ РОСЛИН

Навчальний посібник

Видання друге. Перероблене та доповнене

Відповідальна за випуск **Панчук І.І.**

Літературний редактор **Ряднова В.П.**

Технічний редактор **Чорасєва Г.К.**

Електронне видання

Підписано до друку 28.12.2023.

Умов.-друк. арк. 8,9. Обл.-вид. арк. 8,3.

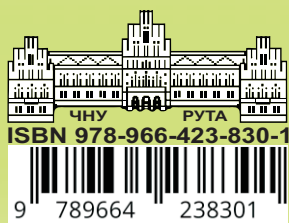
Зам. Н-008.

Видавництво Чернівецького національного університету.

58002, Чернівці, вул. Коцюбинського, 2.

e-mail: ruta@chnu.edu.ua

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 891 від 08.04.2002.



ISBN 978-966-423-830-1

