

**КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра физиологии и биохимии растений

**ПРАКТИКУМ ПО ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
РАСТЕНИЙ
(БЕЛКИ И ФЕРМЕНТЫ)**

Учебно-методическое пособие

Казань – 2012

УДК 581.1

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУВПО
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*учебно-методической комиссии Института фундаментальной
медицины и биологии
Протокол № 2 от 4 июня 2012 г.*

*заседания кафедры физиологии и биохимии растений
Протокол № 2 от 23 мая 2012 г.*

Составители:

канд. биол. наук, ст. преподаватель Ю.Ю. Невмержицкая
докт. биол. наук, проф. О.А. Тимофеева

Рецензент

канд. биол. наук, ст. преподаватель Т.П. Якушенкова

Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): Учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – Казань: Казанский университет, 2012. – 3: с.

Настоящее учебно-методическое пособие является частью содержания большого практикума по физиологии и биохимии растений, проводимого на кафедре физиологии и биохимии растений. В пособии рассмотрены различные методы определения концентрации белка (метод Lowry, метод Bradford, метод ВСА, УФ-спектрофотометрия). Изложены некоторые методы оценки активности ферментов.

Пособие предназначено для студентов, бакалавров, магистрантов и аспирантов, изучающих биохимические показатели растений.

© Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2012
Невмержицкая Ю.Ю., Тимофеева О.А.

Белки́ (протеины, полипептиды) – высокомолекулярные биополимеры, состоящие из соединённых в цепочку пептидной связью альфа-аминокислот. Белки в большинстве случаев состоят из 20 аминокислот, множество их комбинаций даёт большое разнообразие свойств молекул белков. Кроме того, аминокислоты в составе белка часто подвергаются посттрансляционным модификациям, которые могут возникать и до того, как белок начинает выполнять свою функцию, и во время его «работы» в клетке. Функции белков в клетках живых организмов более разнообразны, чем функции других биополимеров. Так, белки-ферменты катализируют протекание биохимических реакций и играют важную роль в обмене веществ.

Методы количественного определения белка

Основным требованием, предъявляемым к методу количественного определения белка, является возможность его применения в присутствии разнообразных внутриклеточных компонентов и нечувствительность к компонентам буферных смесей, используемых для экстракции белков из клеток. В настоящее время не существует метода количественного определения белка, который обладал бы в равной степени специфичностью, чувствительностью, воспроизводимостью, быстротой и простотой проведения, а также отсутствием влияния небелковых компонентов. У каждого метода определения содержания белка есть свои преимущества и недостатки.

Важная роль в исследованиях отводится выбору наиболее подходящего метода определения белка для конкретного эксперимента. Ошибки, допущенные при измерении концентрации белка, будут приводить к накоплению общих ошибок в дальнейших расчетах.

В данном методическом пособии будут рассмотрены наиболее часто и широко применяемые методы определения белка: метод Lowry, метод Bradford, ВСА (bicinchoninic acid, бицинхониновая кислота), а также УФ-спектрофотометрия. Кроме того, включена информация о некоторых приемах, которые помогают преодолеть ограничения, вызванные несовместимостью буферов с выбранным методом определения белка, либо низким содержанием белка в исследуемом образце.

Выбор метода определения белка

Самые распространенные исследования, для которых требуется

предварительное определение содержания белка, – это изучение свойств и функций белков, различные варианты хроматографического и электрофоретического разделения белков (нативный и «голубой нативный» электрофорез, электрофорез в денатурирующих условиях, двумерный и диагональный электрофорез и др.). Для всех этих методов имеет значение не только точность определения, но и возможность проанализировать большое число образцов, различающихся как по составу белков, так и по составу буферов, для их корректного сравнения.

Один из наиболее ответственных моментов при определении концентрации белка – выбор совместимого с анализируемым образцом метода. Поскольку все перечисленные выше методы основаны на специфических свойствах белков, то состав белкового образца и буфера являются главными критериями пригодности метода.

Состав белкового образца является решающим при выборе метода. Если в пробе преобладают белки, обогащенные аминокислотными остатками аргинина, то при определении по Bradford результаты будут завышены, тогда как при использовании метода Lowry или BCA они будут точнее. Напротив, пробы с цистеин-богатыми белками будут давать завышенные результаты с BCA, а применение методов Lowry или Bradford даст значения ближе к истинным. В целом, если необходимо определить содержание белка в сложных белковых смесях, то предпочтительнее методы Lowry и BCA.

Состав буфера также очень важен. Метод Lowry высокочувствителен к такому часто используемому компоненту буферной смеси как ЭДТА, которая мешает образованию хромофора. Метод BCA совместим с широким спектром детергентов, включая додецилсульфат натрия (ДДС-Na), но не допускает восстановителей, например дитиотреитола (ДТТ). Метод Bradford не подходит для высоких концентраций детергентов, но вполне употребим для использования в присутствии восстановителей, таких как ДТТ или 2-меркаптоэтанол. В таблице 1 приведены наиболее распространенные соединения и их предельно допустимые концентрации, которые могут мешать определению белка тем или иным методом. Если подобрать подходящий метод для конкретной буферной системы не удалось; необходимо избавиться от мешающих определению соединений, пример, осаждением белка, после чего белок можно растворять в ответствующем буфере.

Таблица 1

Допустимые концентрации наиболее часто используемых химических веществ, совместимые с различными методами определения белка

Метод Вещество	Предельная концентрация				
	Lowry	BCA	Bradford	УФ	
				280 нм	205 нм
Кислоты и основания					
HCl		0,1 М	0,1 М	> 1 М	0,5 М
NaOH	0,1 М	0,1 М		> 1 М	> 1 М
ТХУ	<1,25%	< 1%		10%	< 1%
Буферы					
Ацетатный		0,2 М	0,6 М	0,1 М	10 мМ
Сульфат аммония	> 28 мМ	20%	1 М	> 50%	9%
Борат		10 мМ			>100мМ
Цитрат	2,5 мМ	< 1 мМ	50 мМ	5%	< 10 мМ
Глицин	2,5 мМ	1 мМ	0,1 М	1М	5 мМ
HEPES	2,5 мкМ	100 мкМ	100 мМ		< 20 мМ
Фосфат	250 мМ	250 мМ	2 М	1 М	50 мМ
Трис	250 мМ	0,1 М	2 М	0,5 М	40 мМ
Детергенты					
CHAPS		2%		10%	< 0,1%
ДДС-Na	1,25%	2%	0,1%	0,1%	0,1%
Тритон X-100	0,25%	2%	0,1%	0,02%	< 0,01%
Твин 20	0,10%	2%		0,3%	0,1%
Октилгликозид		2%		10%	
Дезоксихолат	625мкг/мл		0,25%	0,3%	0,1%
Восстановители					
ДТТ	50 мкМ	< 1 мМ	1 М	3 мМ	0,1 мМ
2-Меркаптоэтанол	1,8 мкМ	< 1%	1 М	10 мМ	< 10 мМ
Разное					
Нуклеиновые кислоты	0,2 мг	0,1 мг	0,25 мг	1 мкг	
ДМСО	> 6,2%	5%		20%	< 10%
ЭДТА	125 мкМ	10 мМ	0,1 М	30 мМ	0,2 мМ
Глицерин	25%	10%	100%	40%	5%
KCl	30 мМ	< 10 мМ	1 М	100мМ	50 мМ

Калибровочный график

Диапазон концентраций белка для калибровки зависит от выбранного метода. Например, метод Bradford довольно чувствительный, но калибровочный график имеет линейный участок в весьма узком интервале концентраций белка.

В идеальном случае калибровочный график нужно строить в каждом опыте, что позволяет добиться более точных результатов. Особенно это касается методов Lowry и BCA, окраски в которых не терминируется. В методе Bradford могут наблюдаться значительные сдвиги калибровочных кривых, поэтому для этого метода рекомендуется хотя бы периодически строить калибровочные графики. При использовании коммерческих наборов и стандартизации процедуры (время, температура) воспроизводимость калибровочных графиков достаточно высока.

Как правило, для построения калибровочного графика служит один стандартный белок, и очень важно выбрать его правильно. Если стандартный белок выбран неудачно, то это может привести к значительным ошибкам (как в сторону завышения, так и занижения) в расчетах абсолютного содержания белка. Однако это не мешает проводить сравнительные исследования содержания белков в различных образцах. Наиболее распространенными стандартами являются бычий сывороточный альбумин (БСА) и овальбумин. Если для определения используется кит (коммерческий набор для определения содержания белка), в составе которого имеется раствор стандартного белка (чаще всего это БСА) с известной концентрацией, именно его и следует брать для построения калибровочного графика.

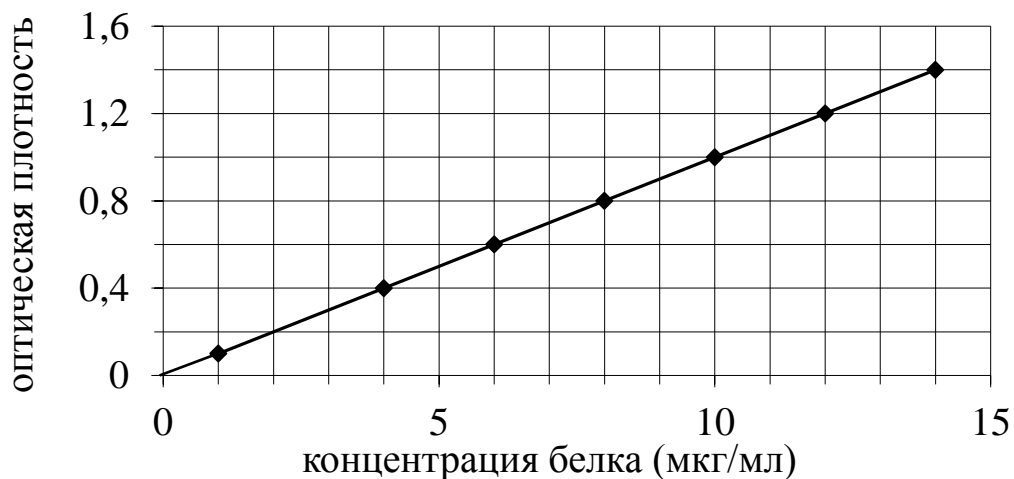


Рис. 1. Пример построения калибровочного графика

Метод Lowry

Этот метод основан на двух различных реакциях. Первая реакция состоит в образовании комплекса катионов меди с амидными связями с последующим восстановлением меди в щелочных условиях. Получаемый продукт называется биуретовым хромофором, который необходимо стабилизировать добавлением тартрата. Вторая реакция – восстановление реагента Folin-Ciocalteu комплексом восстановленной меди с амидными связями, а также аминокислотными остатками тирозина и триптофана. Реагент Folin-Ciocalteu в восстановленном виде синего цвета, поэтому детектируется спектрофотометрически в диапазоне длин волн 500-750 нм. Сама по себе биуретова реакция не очень чувствительна. Использование реагента Folin-Ciocalteu повышает чувствительность метода почти в 100 раз. Метод относительно чувствительный, но требует больше времени, чем другие, и чувствителен ко многим соединениям (табл. 1). Корректному определению мешают: детергенты, углеводы, глицерин, трицин, ЭДТА, трис, соли калия, сульфгидрильные соединения, дисульфиды, фенолы, гуанин, ксантин, магний и кальций. Многие из этих веществ используются в буферах для гомогенизации или подготовки белковых проб, что является одним из основных ограничений данного метода. Помимо этого, метод мало пригоден для измерения содержания гидрофобных белков или содержания белка в мембранных фракциях. Также метод Lowry чувствителен к изменениям в содержании аминокислотных остатков тирозина и триптофана. Линейность калибровочного графика с БСА в качестве стандарта наблюдается при концентрации белка до 1500-2000 мкг/мл. Хотя спектр поглощения окрашенного продукта реакции приходится на 500-750 нм, обычно используют длину волны 660 нм. Другие длины волн также могут использоваться, это позволяет уменьшить эффект от «загрязнения» пробы посторонними веществами. Например, в образцах, выделенных из растительных объектов, хлорофилл будет мешать измерению при 660 нм, но не при 750 нм. Если при 660 нм значения оптической плотности оказались низкими, то измерение поглощения при 750 нм может повысить чувствительность.

Определение концентрации белка по методу Lowry

Ход анализа. Взвешивают на весах 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 50 мл

фосфатного буфера (рН 7,4) в фарфоровой ступке на холоду. Экстракцию белка проводят в течение 1 ч при постоянном помешивании при 4 °С. Затем гомогенат центрифугируют 10 мин при 8 000 g. Супернатант используют для определения белка.

Определение концентрации в опытных образцах. К 0,25 мл определяемого раствора белка приливают 1,25 мл реактива С, перемешивают и оставляют на 5-10 минут. Затем добавляют 0,125 мл реактива Д. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 20-30 мин в темноте. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора. Оптическую плотность раствора измеряют при λ 600-750 нм.

Поскольку при этом реакция никак не останавливается, то следует помнить, что каждые 10 мин оптическая плотность будет увеличиваться. Поэтому необходимо контролировать время, прошедшее до спектрофотометрии. Содержание белка в пробе в мг/л определяют по калибровочной кривой.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях.

Построение калибровочного графика. Для приготовления первого стандартного раствора на весах взвешивают 100 мг белка (БСА) и растворяют в 10 мл H₂O, оставляют для полного растворения в холодильнике на ночь. Концентрация первого стандартного раствора составляет 10 мг/мл. Затем готовят второй стандартный раствор, для этого берут 1 мл первого стандартного раствора и 9 мл H₂O (общий объем этого раствора – 10 мл). Концентрация второго стандартного раствора 1 мг/мл. Из второго стандартного раствора готовят серию разведений в пробирках в соответствии со схемой (табл. 2).

Для построения калибровочного графика берут 0,5 мл соответствующего раствора белка, приливают 2,5 мл реактива С, перемешивают и оставляют на 5-10 минут. Затем добавляют 0,25 мл реактива Д. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 20-30 мин в темноте. Оптическую плотность измеряют при λ 600-750 нм. Контроль - 1 мл воды. После определения оптической плотности по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации, по оси ординат - значения экстинции.

Таблица 2

Приготовление растворов белка для построения калибровочного
графика

№ пробирки	Концентрация раствора белка (мкг/мл)	Количество исходного раствора белка в мкл	Количество H ₂ O в мкл
1.	50 мкг/мл	50	950
2.	100 мкг/мл	100	900
3.	200 мкг/мл	200	800
4.	250 мкг/мл	250	750
5.	300 мкг/мл	300	700
6.	400 мкг/мл	400	600
7.	500 мкг/мл	500	500
8.	600 мкг/мл	600	400

Реактивы.

Реактив А: 2% раствор Na₂CO₃ в 0,1 Н растворе NaOH (готовить в день определения);

Реактив В: 0,5% раствор CuSO₄•5H₂O в 1% растворе KNaC₄H₄O₆Na•4H₂O (хранится неопределенно долгое время);

Реактив С: 50 мл реактива А +1 мл реактива В. Реактивы сливаются в день определения;

Реактив Д: готовят из реактива Фолина, разводя его дистиллированной водой в два раза: 10 мл реактива Фолина + 10 мл H₂O.

Приготовление реактива Folin-Ciocalteu. 100 г вольфрамата натрия (NaWO₄), 25 мг молибдата натрия (Na₂MoO₄) растворяют в 800 мл дистиллированной воды. К раствору прибавляют 50 мл 85% фосфорной кислоты (H₃PO₄) и 100 мл концентрированной соляной кислоты (HCl). Смесь кипятят 10 ч с обратным холодильником. Затем к смеси добавляют 150 г сульфата лития (Li₂SO₄), 50 мл воды и 3-4 капли бромной воды, кипятят в течение 15 мин без обратного холодильника для удаления избытка брома. После охлаждения раствор доводят водой до 1 л, фильтруют и хранят в темной посуде.

Материалы и оборудование:

Проростки гороха, фасоли, пшеницы или ржи.

Фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки, пипетки на 0,025; 0,1; 0,5; 1 мл; мерные цилиндры или колбы на 50, 100,

500 и 1000 мл; пробирки на 3-10 мл, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, дозаторы на 10-1000 мкл, центрифуга, спектрофотометр.

Метод Bradford

Это простой, быстрый, недорогой и чувствительный метод определения содержания белка, вследствие чего он является одним наиболее популярных. Его основное достоинство – чувствительность; метод позволяет надежно определять от 10 до 100 мкг/мл белка.

Метод основан на прямом связывании Кумасси G-250 с аминокислотными остатками аргинина, триптофана, тирозина, гистидина и фенилаланина в белке, причем с аргинином он связывается в восемь раз чаще, чем с другими аминокислотными остатками. Поэтому, если известно, что белок обогащен остатками аргинина (пример, гистон), то в качестве стандарта необходимо также использовать аргинин-богатый белок. Комплекс Кумасси-аргинин имеет максимум поглощения при 595 нм, тогда как сам краситель в растворе – при 470 нм.

Спектры поглощения комплекса и чистого красителя перекрываются, поэтому очень важно следить за соотношением красителя и белка, так как их неконтролируемое изменение будет приводить к ошибкам измерения. Если по какой-то причине метод Bradford используется для определения белка в широком диапазоне концентраций (до 1500 мкг/мл), то очевидно, что калибровочный график не будет линейным. Однако им можно пользоваться если «разбить» его на линейные отрезки с целью получения линейной зависимости для каждого участка.

Еще один аспект, возникающий при использовании этого метода – возможное взаимодействие компонентов буфера образца с красителем (табл. 1). Необходимо проверять реакцию буферной смеси, в которой находится белок, на взаимодействие с красителем. В случае взаимодействия, необходимо удалить эти компоненты из раствора.

При постановке реакции Bradford используют соотношение объема реактива Bradford к образцу равное 50:1 (минимально рекомендуемый объем соответствует 200 мкл реагента и 4 мкл образца).

Следует отметить, что для измерения лучше использовать стеклянные кюветы, так как на стенках кварцевых и пластиковых кювет адсорбируется значительное количество красителя.

Определение концентрации белка по методу Bradford

Ход анализа. Взвешивают на весах 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 50 мл фосфатного буфера (рН 7,4) в фарфоровой ступке на холоду. Экстракцию белка проводят в течение 1 ч при постоянном помешивании при 4 °С. Затем гомогенат центрифугируют 10 мин при 8 000 g. Супернатант используют для определения белка.

Определение концентрации в опытных образцах.

0,1 мл раствора препарата, содержащего 0,01-0,1 мг испытуемого белка помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале, как правило, 10 мин. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора. Содержание белка в пробе в мг/л определяют по калибровочному графику.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях.

Построение калибровочной кривой

Калибровочную кривую строят, используя бычий сывороточный альбумин (БСА) или яичный альбумин. Приготовление раствора БСА: 10 мг БСА растворить в 10 мл дистиллированной воды – концентрация раствора 1 мг/мл. Затем готовят второй стандартный раствор, для этого берут 1 мл первого стандартного раствора и 9 мл H₂O (общий объем этого раствора – 10 мл). Концентрация второго стандартного раствора 0,1 мг/мл. Из второго стандартного раствора готовят серию разведений в пробирках в соответствии со схемой (табл. 3).

Для построения калибровочного графика берут 0,1 мл соответствующего раствора белка, помещают в пробирки, прибавляют 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале, как правило, 10 мин. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора. После определения оптической плотности по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации, по оси ординат - значения экстинции.

Приготовление растворов белка для построения калибровочного
графика

№ пробирки	Концентрация раствора белка (мкг/мл)	Количество исходного раствора белка в мкл	Количество H ₂ O в мкл
1.	10 мкг/мл	100	900
2.	20 мкг/мл	200	800
3.	30 мкг/мл	300	700
4.	40 мкг/мл	400	600
5.	50 мкг/мл	500	500
6.	60 мкг/мл	600	400
7.	70 мкг/мл	700	300
8.	80 мкг/мл	800	200
9.	100 мкг/мл	1000	-

Реактивы:

1) Приготовление реактива Bradford.

100 мг красителя Кумасси ярко-голубого (Coomassie Blue Brilliant G-250) растворить в 50 мл 96% этанола. Затем к этому раствору, постоянно перемешивая его стеклянной палочкой, добавить 100 мл 85% фосфорной кислоты. При добавлении фосфорной кислоты окраска раствора из синего должна перейти в коричневый. В стакан объёмом 1 л налить 500-700 мл дистиллированной воды и медленно, помешивая воду стеклянной палочкой, добавлять в неё раствор, содержащий краситель Кумасси голубой, этанол и фосфорную кислоту. Довести раствор до 1 литра и оставить на ночь при комнатной температуре. После этого полученный раствор необходимо профильтровать. Реактив Bradford хранить в холодильнике в колбе из темного стекла с притёртой пробкой. При длительном хранении (более 1 месяца) реактив необходимо повторно калибровать.

Материалы и оборудование:

Проростки гороха, фасоли, пшеницы или ржи.

Фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки, пипетки на 0,025; 0,1; 0,5; 1 мл; мерные цилиндры или колбы на 50, 100, 500 и 1000 мл; пробирки на 3-10 мл, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, дозаторы на 10-1000 мкл, центрифуга, спектрофотометр.

Определение белка с ВСА-реагентом

Этот метод основан на взаимодействии ионов Cu^{2+} с белками в щелочных условиях, что приводит к переходу катионов Cu^{2+} в Cu^{1+} , которые детектируются с высокой чувствительностью бицинхониновой кислоты (ВСА). При этом зеленый цвет реагента меняется на пурпурный, интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в растворе. Долгое время считалось, что механизм, лежащий в основе этого метода, похож на механизм метода Lowry. В настоящее время известно, что определение содержания белка с бицинхониновой кислотой основано на двух разных реакциях с ионами меди. Первая реакция протекает при низких температурах и является результатом взаимодействия меди и ВСА с аминокислотными остатками цистеина, цистина, триптофана и тирозина. При повышении температуры пептидная связь также ответственна за развитие окраски. Таким образом, проведение реакции при 37°C , а не при комнатной температуре повышает чувствительность и уменьшает колебания измерений в зависимости от аминокислотного состава белков. Следует помнить, что после 37°C оптическая плотность контрольной пробы увеличивается 2% за каждые 10 мин, поэтому после охлаждения пробы до комнатной температуры следует сразу же приступить к измерению. Чувствительность этого метода можно повысить, если инкубировать пробы при 60°C .

Бицинхониновая кислота заменяет реагент Folin-Ciocalteu, используемый в методе Lowry. ВСА образует комплекс с Cu^+ , который имеет максимум поглощения при 562 нм. Преимущество этого реагента в том, что он не взаимодействует со многими компонентами буферных смесей, особенно с детергентами. Вещества, которые могут мешать определению, – это либо восстановители Cu^{2+} (например, ДТТ), либо хелаторы (ЭДТА). Тем не менее, эти компоненты буферов не являются критическими, поэтому от них довольно легко можно избавиться.

Этот метод можно использовать для измерения белка в широком диапазоне (до 2000 мкг/мл), причем линейность калибровочного графика наблюдается практически во всем диапазоне концентраций.

Достоинство метода состоит и в том, что он нечувствителен как к ионным, так и неионным детергентам. В связи с этим метод может успешно применяться для определения содержания мембранных и гидрофобных белков.

Определение концентрации белка с ВСА реагентом

Ход анализа. Взвешивают на весах 500 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 50 мл фосфатного буфера (рН 7,4) в фарфоровой ступке на холоду. Экстракцию белка проводят в течение 1 ч при постоянном помешивании при 4 °С. Затем гомогенат центрифугируют 10 мин при 8 000 g. Супернатант используют для определения белка.

Определение концентрации в опытных образцах.

Для определения концентрации белка к 25 мкл раствора белка добавить 500 мкл реактива С и инкубировать при 37 °С в течение 30 мин, охлаждают при комнатной температуре и через 60 мин после окончания инкубации при 37 °С измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 562 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм относительно растворителя. Содержание белка определяют по калибровочному графику.

Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) биологических и аналитических повторностях.

Построение калибровочного графика. Для приготовления первого стандартного раствора на весах взвешивают 100 мг белка (бычий альбумин) и растворяют в 10 мл H₂O, оставляют для полного растворения на ночь в холодильнике. Концентрация первого стандартного раствора составляет 10 мг/мл. Затем готовят второй стандартный раствор, для этого берут 1 мл первого стандартного раствора и 9 мл H₂O (общий объем этого раствора – 10 мл). Концентрация второго стандартного раствора 1 мг/мл. Из второго стандартного раствора готовят серию разведений в пробирках по схеме (табл.4).

Для построения калибровочной кривой берут 0,1 мл соответствующего раствора белка, приливают 2 мл реактива С. Инкубируют растворы при 37 °С в течение 30 мин, охлаждают при комнатной температуре. Через 60 мин после окончания инкубации при 37 °С измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 562 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм относительно воды. После определения оптической плотности по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации, по оси ординат – значения экстинции.

Приготовление растворов белка для построения калибровочного
графика

№ пробирки	Концентрация раствора белка (мкг/мл)	Количество исходного раствора белка в мкл	Количество H ₂ O в мкл
1.	50 мкг/мл	50	950
2.	100 мкг/мл	100	900
3.	200 мкг/мл	200	800
4.	300 мкг/мл	300	700
5.	500 мкг/мл	500	500
6.	600 мкг/мл	600	400
7.	700 мкг/мл	700	300

Реактивы.

Реактив А: 1% Na бичинхонинат (BCA), 2% Na₂CO₃, 0,95% NaHCO₃, 0,16% Na тартрат, 0,4% NaOH, рН 11.25. Для приготовления реактива А берут 10 г бичинхониновой кислоты или ее динатриевой соли, 20 г Na₂CO₃, 1,6 г Na тартрат, 4 г NaOH, 9,5 г NaHCO₃, доводят объем раствора водой до 1 л и перемешивают. При необходимости рН доводят раствором NaOH 10% или NaHCO₃ 5%.

Реактив В: 4% CuSO₄.

Реактив С: смешать 50 мл реактива А и 1 мл реактива В.

Материалы и оборудование.

Проростки гороха, фасоли, пшеницы или ржи.

Фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки, пипетки на 0,025; 0,1; 0,5; 1 мл; мерные цилиндры или колбы на 50, 100, 500 и 1000 мл; пробирки на 3-10 мл, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, дозаторы на 10-1000 мкл, центрифуга, спектрофотометр.

УФ-метод определения содержания белка

Измерение спектра поглощения в УФ-диапазоне — наиболее быстрый и простой метод определения белка, но и наименее точный. Определение концентрации путем измерения УФ-поглощения, обычно при 280 нм, зависит от присутствия ароматических аминокислот в белках. Тирозин и триптофан поглощают при 280 нм, тогда как максимум поглощения фенилаланина — при 260 нм. Метод чувствителен к значениям рН и ионной силы, которые определяют пространственную

организацию белков и их комплексов.

Если белковый образец загрязнен и неизвестен коэффициент молярной экстинкции белка, определение концентрации белка УФ-методом приведет к неправильным результатам. Этот метод желательно использовать для быстрой оценки концентрации белка, предшествующей более точным измерениям, описанным выше. Для расчета приблизительной концентрации используется следующее уравнение:

$$\text{Концентрация белка, мг/мл} = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$$

Этот метод хорошо подходит для сравнения различных растворов одного белка. Если взять раствор чистого белка с известным коэффициентом молярной экстинкции, то можно точно определить концентрацию, измерив оптическую плотность при 280 нм. Для многих индивидуальных белков коэффициенты экстинкции известны.

Но этот метод не подходит для измерений без предварительной очистки смеси белков от УФ-поглощающих компонентов, например, нуклеиновых кислот. Кроме того, различные белки отличаются по аминокислотному составу и поэтому имеют разные молярные коэффициенты поглощения, что следует учитывать при расчетах.

Кюветы из стекла и полистераола также поглощают УФ, поэтому для этого метода используют кварцевые кюветы. УФ-метод наименее чувствительный из всех, представленных выше. Но и его чувствительность может быть повышена при изменении длины волны от 210 до 225 нм. Однако при таких длинах волн повышается вероятность ошибки измерения, так как в этом диапазоне поглощают практически все органические вещества.

Определение содержания суммарных белков в свежем и сухом растительном материале

Ход анализа.

Выделение суммарных белков из свежего растительного материала. Для выделения белковых растворов используют щелочные растворы, так в них большинство белков довольно хорошо растворяются.

Помещают в фарфоровую ступку навеску листьев, корней клубней или других вегетативных органов (0,5 г) и фиксируют жидким азотом. Затем тщательно растирают в ступке с 20 мл боратного буфера рН 10, в который добавляют бисульфит натрия в концентрации 0,2% и несколько

капель октилового спирта. Бисульфит натрия повышает растворимость белковых веществ, а октиловый спирт необходим для предотвращения вспенивания гомогената. Для экстракции белков гомогенат встряхивают на ротаторе в течение 1-2 ч, затем центрифугируют в течение 5-10 мин при 3 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в колбу объемом 50 мл и в дальнейшем используют для определения концентрации белка. Остатки клеток вновь гомогенизируют в ступке в 10 мл боратного буфера рН 10 с прокаленным песком. Затем гомогенат вновь встряхивают в течение 20-30 минут и опять центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают в ту же мерную колбу (при этом объем белкового экстракта составляет 30 мл) и доводят буферным раствором до 50 мл. Содержание белка определяют спектрофотометрически.

Выделение суммарных белков из сухого растительного материала. Взвешивают на аналитических весах 0,5 г сухих семян злаковых или 0,8-1,0 г зерновок, полученных после прорастания. Навески должны быть размолоты до состояния муки, так как от этого будет зависеть полнота извлечения белков. Навеску муки помещают в коническую колбу на 100 мл, заливают 30 мл боратного буфера рН 10, содержащего 0,2 % бисульфита натрия и несколько капель октилового спирта. Колбу закрывают пробкой и помещают на ротатор на 1 ч при комнатной температуре, чтобы сухой материал впитал в себя буфер. Затем содержимое колбы центрифугируют в течение 5-10 мин при 3-4 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в колбу объемом 50 мл. Центрифужные пробирки смывают буферным раствором и переносят осадок в конические колбы с небольшим объемом буфера (10-15 мл) и встряхивают на ротаторе. Через 30-40 мин проводят центрифугирование в течение 5-10 мин при 3-4 тыс. об/мин, надосадочную жидкость переносят в ту же мерную колбу объемом 50 мл и доводят объем экстракта буфером до метки. Содержание белка в экстракте проводят спектрофотометрически.

Последующие операции при определении концентрации суммарных белков общие для обоих видов экстракции.

По окончании экстракции в штатив помещают пробирки и дозатором переносят в них по 1 мл белкового экстракта. Туда же приливают 9 мл боратного буфера с рН 10, тщательно перемешивают, после чего раствор суммарных белков готов к спектрофотометрированию.

Спектрофотометрирование проводят на любом спектрофотометре, снимая показания светопоглощения (синонимы - оптическая плотность, экстинкция) при 280 и 260 нм. Показания светопоглощения шкалы прибора подставляют в уравнение:

$$\text{Концентрация белка, мг/мл} = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$$

где A_{280} и A_{260} светопоглощение раствора белков при 280 и 260 нм; 1,55 и 0,76 - расчетные коэффициенты.

В качестве раствора сравнения вместо образца берут аналогичное количество буфера или экстрагирующего раствора.

Результаты записывают по форме:

Таблица 5

Определение содержания белка в навеске

№ п/п	Навеска растительного материала, г (Н)		Объем экстракта белков, мл (V)	Светопоглощение		Концентрация белков (С)	Масса белков в навеске, мг (M=C•V)	Концентрация белков в навеске %, M•100%/ Н•1000
	сырой вес	сухой вес		280 нм	260 нм			
1.								
2.								

Окончательный расчет содержания суммарных белков в навеске злаковых и зернобобовых культур (мг/г сухой массы) выполняют по формуле:

$$\text{ССБ} = \text{С} \cdot 50 \cdot 10 / \text{Н} \cdot 100 / 86 \text{ (или 60)},$$

где Н - навеска растительного материала, г; 50 - объем экстрагирующего раствора, мл; 10 - разведение; 86 – коэффициент для воздушносухой навески, %; 60 – коэффициент для сухой массы проросших семян, %.

Материалы и оборудование.

Проростки и проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, мука злаковых, боратный буфер с рН 10, содержащий 0,2 % бисульфита натрия; октиловый спирт; кварцевый песок.

Фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки, пипетки на 0,025; 0,1; 0,5; 1 мл; мерные цилиндры или колбы на 50, 100, 500 и 1000 мл; пробирки на 3-10 мл, мерные цилиндры на 10 и 25 мл, дозаторы на 10-1000 мкл, центрифуга, спектрофотометр.

Приготовление боратного буфера (рН 10).

Для приготовления боратного буфера необходимы запасные растворы:

А: 0,05 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ – тетрабората натрия (19,05 г в 1000 мл);

В: 0,2 М NaOH ;

Смешивают в соотношении: 50 мл раствора А + 43 мл раствора В и разбавляют дистиллированной водой до 200 мл

Определение свободного пролина

Пролин (про, про, Р) – гетероциклическая аминокислота, содержание которой увеличивается многократно при стрессовых воздействиях. Накопление пролина помогает растениям адаптироваться к неблагоприятным условиям, защищая от инактивации белки, ДНК, ряд ферментов и другие важнейшие клеточные компоненты. Одним из химических свойств пролина является его способность «тушить» синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и гидроксил радикал (OH^\bullet).

Заметное увеличение содержания свободного пролина в различных органах растений при стрессах вызывает интерес многих исследователей в связи с возможностью использования этого показателя в качестве биохимического маркера в защитных реакциях растений.

Принцип метода. Нингидриновая реакция является универсальной реакцией на все аминокислоты, имеющие группу в α -положении. Растворы белка и пептидов, имеющие свободную α -аминогруппу также как и α -аминокислоты при нагревании с нингидрином дают синее или фиолетовое окрашивание. В этой реакции α -аминокислоты и пептиды окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию, декарбоксилированию с образованием аммиака, альдегида и CO_2 .

Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий, фиолетовый, красный, а в случае пролина – в желтый цвет.

Для построения калибровочной кривой берут по 2 мл полученных растворов *L*-пролина, помещают в пробирки и добавляют 2 мл реагента, который готовят непосредственно перед опытом, растворяя 1,25 г нингидрина в смеси 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл фосфорной кислоты (6 моль/л). Затем в пробирки добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты. После тщательного перемешивания содержимого пробирки ставят на 1 ч в кипящую водяную баню. После этого пробирки охлаждают под холодной водой или в ледяной бане. Далее в каждую пробирку добавляют 4 мл толуола, взбалтывают 20-30 с и дают отстояться. Через 10-15 мин верхний слой толуола, в который переходит весь краситель, отделяют от водной фазы. Интенсивность окраски измеряют на ФЭКе при 520 нм против толуола. После определения оптической плотности по полученным цифрам строится калибровочная кривая. На оси абсцисс откладываются значения концентрации, по оси ординат – значения экстинции.

Ход анализа. В чашках Петри на фильтровальной бумаге в воде выращивают 7-10-дневные проростки овса, пшеницы, гороха или фасоли. Затем воду сливают и заливают в чашки 18%-й раствор сахарозы. Через 48 или 72 ч определяют содержание пролина в срезанных листьях после осмотического стресса, предварительно определив его исходное содержание. Параллельно берут две-три пробы листьев (100 мг), высушивают их при 105 °С и находят сухую массу.

Для определения свободного пролина берут три пробы листьев по 1 г каждая. Мелко их нарезают, заливают 10 мл 3%-го раствора сульфосалициловой кислоты и растирают в течение 5 мин в ступках до получения однородной массы, растертую массу переносят на фильтр. Затем берут 2 мл фильтрата и проводят дальнейшее определение как при построении калибровочной кривой. Концентрацию пролина определяют по калибровочному графику. Результаты расчета выражают в миллиграмм-процентах на сухое вещество, предварительно определив, сколько сухого вещества содержится в 1 г сырых листьев в контроле и при недостатке воды.

Материалы и оборудование.

18%-й раствор сахарозы; 3%-й раствор сульфосалициловой кислоты; нингидрин; ледяная уксусная кислота; фосфорная кислота (6 моль/л); толуол; пролин; торзионные весы; сушильный шкаф; ступки; водяная баня; кюветы со льдом; пробирки; стеклянные воронки; пипетки; складчатые фильтры; колбы на 50 мл; чашки Петри; ФЭК.

Определение активности ферментов

Ферментами называются коллоидные органические соединения, которые образуются в животных и растительных организмах и являются катализаторами протекающих в них биохимических процессов. По своей химической природе ферменты принадлежат к белковым веществам. Физические и химические свойства ферментов обусловлены их белковой природой: они термолабильны, способны высаливаться, и дают характерные для белка качественные реакции. Активность фермента очень сильно зависит от рН среды, присутствия электролитов и других веществ, активирующих или наоборот ингибирующих их действие. Поэтому необходимо создание стандартных условий, чтобы можно было сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях – оптимальная рН и фиксированная температура, например, 25 °С или 37 °С, соблюдение времени инкубации субстрата с ферментом. Для определения активности фермента необходимо наличие избытка субстрата, чтобы работали все имеющиеся в растворе молекулы фермента.

В повседневной биохимической практике практически не оценивается количество фермента, а только его активность. Активность – более широкое понятие, чем количество. Она подразумевает в первую очередь результат реакции, а именно убыль субстрата или накопление продукта. Естественно, при этом нельзя игнорировать время, которое проработал фермент и число молекул фермента. Но так как число молекул фермента подсчитать обычно нереально, то используют количество биологического материала, содержащего фермент (объем или массу). Таким образом, при определении активности ферментов учитывают три меняющихся фактора:

- масса полученного продукта или исчезнувшего субстрата;
- время, потраченное на реакцию;
- количество биологического материала, содержащего фермент.

Активность фермента выражается в скорости накопления продукта или скорости убыли субстрата в пересчете на количество материала, содержащего фермент:

$$\text{Активность фермента} = \frac{\text{количество продукта или субстрата}}{\text{единица времени} \times \text{единица массы или объема пробы}}$$

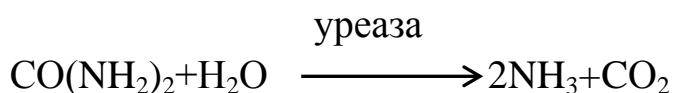
Как правило, обычно используют:

- единицы количества вещества – моль (и его производные ммоль, мкмоль), грамм (кг, мг);
- единицы времени – минута, час, секунда;
- единицы массы или объема – грамм (кг, мг), литр (мл).

Активно используются и другие производные – катал (моль/с), международная единица активности (МЕ, Unit) соответствует мкмоль/мин. Таким образом, активность фермента может выражаться, например, в ммоль/с×л, г/час×л, МЕ/л, катал/мл и т.д.

Определение активности уреазы

Уреаза, или карбамид-амидогидролаза (Н. Ф. 3.5.1.5), - фермент, широко распространенный в растениях. Он катализирует гидролитическое расщепление мочевины на аммиак и углекислый газ по следующей схеме:



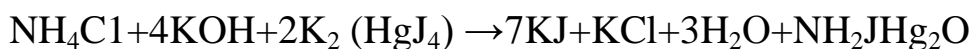
Принцип метода. Определение активности уреазы основано на учете количества аммиака, образовавшегося в единицу времени под действием препарата фермента, выделенного из растений. Количество аммиака определяют колориметрически с реактивом Несслера.

Ход определения. Для приготовления препарата фермента 3-5 г свежемолотой соевой муки (или муки других бобовых) тщательно растирают в фарфоровой ступке в смеси из 48 мл воды и 2 мл 0,1 н НСl. Смесь взбалтывают 1 ч, а затем центрифугируют 30 мин при 5-7 тыс. об/мин. Полученный прозрачный раствор используют в качестве препарата уреазы.

В коническую колбу на 50 мл вносят от 1 до 10 мл препарата уреазы и 5 мл 0,1 М раствора мочевины в 1/15 М фосфатном буфере рН 7,0 и инкубируют 30 мин при 37°С. После этого уреазу инактивируют, для чего в колбу добавляют 5 мл 2 н НСl.

Затем определяют содержание аммиака с реактивом Несслера, который представляет собой щелочной раствор йодистой ртутно-калиевой соли $\text{K}_2(\text{HgJ}_4)$. Для 5-10 мл вытяжки переносят в мерную колбу емкостью 50 мл, горлышко колбы обмывают водой, добавляют 2,5 мл 25%-наго раствора сегнетовой соли и осторожно нейтрализуют 1 н NaOH, используя в качестве индикатора лакмусовую бумагу. Добавление сегнетовой соли необходимо для предотвращения выпадения в осадок солей кальция и магния, находящихся в растворе.

Затем общий объем жидкости доводят водой примерно до 40 мл и прибавляют 2 мл реактива Несслера. Образуется йодистый меркураммоний желтого цвета.



Колбу доводят водой до метки, несколько раз перемешивают и через 15 мин определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре в кюветах толщиной 2 см при синем или зеленом светофильтре (410 нм).

Параллельно ведут контрольное определение содержания аммиачного азота в ферментном препарате. Для этого к 10 мл ферментного препарата сразу же добавляют 5 мл 2 н HCl, а затем приливают 5 мл 0,1 М раствора мочевины в 1/15 М фосфатном буфере рН 7,0. Инкубацию и дальнейшую обработку контрольных проб проводят так же, как в опытных.

Вычисление результатов. Количество аммиака, образовавшегося под действием уреазы, определяют по разности между содержанием аммиака в опытной и контрольной колбах.

Построение калибровочного графика. Содержание аммиака определяют по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика в колбу емкостью 50 мл берут по 1; 2; 4; 8; 10; 15 и 20 мл образцового раствора хлористого аммония, содержащего 0,01 мг NH₃ в 1 мл, приливают воду и сегнетовую соль, окрашивают реактивом Несслера и колориметрируют, как указано выше. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс содержание аммиака, а на оси ординат - оптическую плотность.

Активность уреазы выражают в мкг образовавшегося аммиака (или в мкг гидролизованной мочевины) на 1 г навески за 1 мин.

Материалы и оборудование. 1) фотоэлектроколориметр, ротатор, центрифуга, термостат, ступки фарфоровые, колбы конические емкостью 50 мл, пипетки градуированные;

2) 0,1 н и 2 н HCl; 1 н NaOH; 0,1 М раствор мочевины в 1/15 М фосфатном буфере; 25%-ный раствор сегнетовой соли; реактив Несслера; образцовый раствор хлористого аммония.

3) проростки и проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, мука злаковых.

Реактив Несслера. Как правило, используют готовый реактив Несслера. Он хранится в склянке из темного или оранжевого стекла,

плотно закрытым каучуковой пробкой в помещении, где нет аммиака. Цвет реактива должен быть светло-желтым.

Для приготовления реактива Несслера в 15 мл дистиллированной воды растворяют 10 г йодистого калия, добавляют 15 г HgJ_2 , тщательно перемешивают и туда же приливают 80 мл 50%-ного раствора КОН. Перемешивают и общий объем доводят водой (не содержащей углекислоты) до 500 мл. Оставляют в темноте на сутки, после чего фильтруют через стеклянную вату. Раствор должен быть прозрачным.

Образцовый раствор хлористого аммония. 0,382 г химически чистого NH_4Cl растворяют в 1 л бидистиллированной воды и получают запасной раствор с содержанием 0,1 мг азота в 1 мл. Образцовый раствор с содержанием 0,01 мг азота в 1 мл получают разбавлением запасного раствора в 10 раз.

Приготовление 1/15 М фосфатного буфера рН 7,0.

Раствор А: 1/15 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,866 г в 1 л)

Раствор В: 1/15 М KH_2PO_4 (9,073 г в 1).

Буфер готовится смешиванием 61,2 мл раствора А + 38,8 мл раствора В.

Определение активности фосфатаз

Щелочная (Н.Ф.3.1.3.1) и кислая (Н.Ф.3.1.3.2) фосфатазы, или фосфомоноэстеразы, участвуют в гидролизе ортофосфорнокислых эфиров различных спиртов и фенолов. В отличие от некоторых других фосфатаз (5-нуклеотидазы, фосфоамидазы, аденозинтрифосфатазы и др.), гидролизующих строго определенные субстраты, кислая и щелочная фосфатазы обладают широкой специфичностью.

Оптimum действия щелочной фосфатазы проявляется при значениях рН от 8,9 до 9,6, а кислой от 4,5 до 5,3.

Принцип метода. Определение активности щелочной и кислой фосфатаз основано на количественном учете неорганического фосфора, образующегося при расщеплении органических фосфорных соединений в строго определенных условиях под действием этих ферментов.

Ход определения. При определении активности кислой фосфатазы используют боратный или гликоколевый буферный раствор рН 5,3, а щелочной фосфатазы - боратный буфер рН 9,0.

Берут 3-5 г растительной ткани (листья, стебли, корни, семена или другие изучаемые части растений), растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством стеклянного песка и 5-10 мл боратного или гликоколевого буфера. После этого суспензию из ступки переносят в

мерную колбу на 25 мл. Ступку смывают несколько раз небольшими порциями того же буфера, общий объем в колбе доводят до 25 мл и содержимое колбы тщательно перемешивают. Для получения прозрачного раствора суспензию переносят из колбы в центрифужные пробирки и центрифугируют 5-10 минут при 3000 об/мин. Надосадочная жидкость служит в качестве исходного ферментного препарата для определения активности фосфатаз.

В мерную пробирку наливают 2 мл буфера с соответствующим значением рН, 0,2 мл 0,001 М раствора $MgCl_2$ и 1 мл субстрата - глицерофосфата натрия с концентрацией 5 мг в 1 мл.

Затем в пробирку вносят точно 2,5 мл ферментного препарата. Содержимое пробирки перемешивают, интенсивно встряхивая, и инкубируют в термостате в течение 2 ч при температуре 35°C. После инкубации для прекращения ферментативной реакции и осаждения белков в смесь (пробирку) добавляют 3 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Общий объем смеси доводят дистиллированной водой до 10 мл и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют 10 мин при 5000 об/мин.

В осветленном растворе колориметрическим методом с применением аскорбиновой кислоты определяют содержание фосфора. Для определения берут 0,5 мл экстракта, содержащего фосфор; добавляют 5 мл ацетатного буфера рН 4,0; 0,5 мл 1%-ного молибдата аммония и 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты. Общий объем смеси 6,5 мл. Через 10 мин раствор колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре (длина волны 750 – нм), используя кюветы шириной 10 мм.

Параллельно проводят «холостое» определение неорганического фосфора. Для этого в реакционную смесь сразу же после добавления препарата фермента приливают трихлоруксусную кислоту, чтобы предотвратить ферментативное расщепление фосфора.

Таким образом, в одном растительном образце определяют неорганический фосфор дважды (каждый раз в 2-3-кратной повторности): первый раз - сразу после прекращения ферментативного расщепления органических фосфатов («холостое» определение), второй - после двухчасового действия фермента.

Количественная разница между вторым и первым определениями служит мерой активности фермента. Активность фермента выражают в мг неорганического фосфора (P_2O_5) на 1 г растительной ткани.

Пример расчета. Допустим, что для приготовления препарата фермента брали 5 г растительной ткани и после растирания в ступке довели общий объем до 25 мл. Для инкубации брали 2,5 мл ферментного препарата, а для колориметрического определения P_2O_5 - 0,5 мл прозрачного раствора. Установили, что в этих 0,5 мл разность между вторым и первым определениями неорганического фосфата составляет 0,96 мг P_2O_5 . Следовательно, в общем объеме инкубационной смеси (10 мл), что соответствует 2,5 мл ферментного препарата, содержится $0,96 * 5 = 4,8$ мг P_2O_5 , а в 25 мл ферментного препарата содержится X мг P_2O_5 .

$$X = (25 * 4,8) / 2,5 = 48 \text{ мг}$$

Затем рассчитываем содержание P_2O_5 на 1 г сырой массы, для этого 48 мг делим на навеску (5 г) и получаем 9,6 мг P_2O_5 .

Таким образом, активность щелочной фосфатазы равна 9,6 мг P_2O_5 на 1 г сырой ткани за 2 ч или 4,8 мг за 1 ч.

Оборудование и реактивы:

1) центрифуга, термостат, фотоэлектроколориметр, фарфоровая ступка, мерные пробирки, пипетки;

2) боратный буфер рН 9,0 и рН 5,3; 0,1 н гликоколевый буфер рН 9,0; 0,001 М раствор $MgCl_2$, субстрат - раствор глицерофосфата натрия в концентрации 5 мг в 1 мл, трихлоруксусная кислота 10%-ная, образцовый раствор и реактивы для определения фосфора с помощью аскорбиновой кислоты.

Приготовление боратного буфера рН 9,0.

Берут 85,6 мл 0,05М раствора тетрабората натрия (12,367 г H_3BO_3 +100 мл раствора NaOH в 1 л) и доводят до 100 мл 0,1 н HCl.

Приготовление боратного буфера рН 5,3.

Берут 0,05М раствор тетрабората натрия и доводят 0,1 н. раствором HCl до рН 5,3.

Приготовление 0,1 н гликоколевого буфера рН 9,0.

12,4 мл 0,1 н. NaOH доводят до 100 мл 0,1 н. раствором гликоколя (7,507 г гликоколя+5,85 г NaCl в 1 л).

Определение фосфора с применением аскорбиновой кислоты.

Метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определять от 0,3 до 6 мкг фосфора в 1 мл колориметрируемого раствора. Чувствительность метода повышается в присутствии ионов меди в инкубационной среде.

Построение калибровочной кривой. Готовят стандартный раствор однозамещенного фосфата калия, для чего 0,439 г $\text{KН}_2\text{PO}_4$ растворяют в 1 л дистиллированной воды в присутствии 20 мл 0,1 н H_2SO_4 . В 1 мл этого раствора содержится 0,1 мг фосфора. Стандартный раствор разбавляют в 4 раза (25мл раствора фосфата в мерной колбе на 100 мл доводят водой до метки). В 1 мл приготовленного рабочего раствора содержится 0,025 мг фосфора.

Для построения калибровочной кривой берут образцовые растворы фосфата объемом от 0,05 до 0,5 мл. Объем ацетатного буфера рН 4,0 изменяют от 5,45 до 5 мл в зависимости от взятого объема фосфата (табл. 7). Добавляют 0,5 мл 1%-ного молибдата аммония и 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты. Общий объем смеси 6,5 мл. Через 10 мин раствор колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре (длина волны 750 – нм), используя кюветы шириной 10 мм.

Таблица 7

Приготовление растворов $\text{KН}_2\text{PO}_4$ для построения калибровочного графика

№ пробирки	Концентрация раствора $\text{KН}_2\text{PO}_4$ (мкг/мл)	Количество исходного раствора $\text{KН}_2\text{PO}_4$ в мл	Количество ацетатного буфера в мл
1	12,5 мкг/мл	0,05	5,45
2	25 мкг/мл	0,1	5,4
3	50 мкг/мл	0,2	5,3
4	75 мкг/мл	0,3	5,2
5	100 мкг/мл	0,4	5,1
6	125 мкг/мл	0,5	5,0

Материалы и оборудование. 1) фотоэлектроколориметр, градуированные пипетки, пробирки;

2) ацетатный буфер рН 4,0; молибденовокислый аммоний 1%-ный, приготовленный на 0,05 н H_2SO_4 , аскорбиновая кислота 1%-ная;

3) проростки и проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, мука злаковых.

Приготовление ацетатного буфера рН 4,0.

1 н уксусная кислота 284,4 мл + 50 мл 1 н NaOH разбавляют дистиллированной водой до 500 мл.

Определение активности амилолитических ферментов в прорастающих семенах

Амилазы объединяют большую группу ферментов, которые осуществляют гидролиз преимущественно α -(1,4)-гликозидной связи в амилозе, амилопектине, гликогене и других мальтоолигосахаридах.

Амилазы являются основными ферментами семян злаков, расщепляющими гранулы крахмала с образованием декстринов и сахаров. Количество амилаз в семени, находящемся в состоянии покоя, незначительно, но с прорастанием семени оно возрастает. Ведущая роль в процессе расщепления крахмала принадлежит α -амилазе, обладающей способностью расщеплять крахмал до декстринов. В непроросшем зерне α -амилаза не обнаруживается. β -амилаза расщепляет крахмал до мальтозы, которая при действии мальтазы превращается в конечный продукт – глюкозу, в покоем зерне содержится в свободной и связанной формах, при проращивании количество активной β -амилазы значительно возрастает.

Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной эндоамилазой является α -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей в полимерных цепях субстрата. Глюкоамилаза и β -амилаза являются экзоамилазами, т.е. ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

Реакции, катализируемые амилазами, имеют две стадии: короткую предстационарную и длительную – стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться иодом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы.

Принцип метода. α -амилаза гидролизует крахмал с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. При взаимодействии крахмала с йодом образуется окрашенный комплекс, оптическая плотность которого при 595 нм пропорциональна концентрации негидролизованного крахмала. Активность α -амилазы оценивают по уменьшению интенсивности окраски.

Ход определения. Навеску (4 г) суточных проростков пшеницы растирают в фарфоровой ступке пестиком при добавлении небольшого количества стекла и 10 мл 1 %-го раствора NaCl до получения однообразной мелкодисперсной кашицы. Суспензию количественно

переносят в мерную колбу на 50 мл и после ополаскивания ступки и пестика небольшими порциями раствора NaCl (до 50 мл), проводят экстракцию ферментов в течение 1 часа при 3-4⁰С и постоянном перемешивании, затем полученный экстракт центрифугируют при 5000g 15 минут. Полученную надосадочную жидкость (по 1мл) используют в качестве ферментативного препарата для определения активности амилаз при помощи специально приготовленных растворов чистого крахмала заданной концентрации.

Для определения суммарной активности амилаз в чистые пробирки вносят по 3 мл 0,2 н ацетатного буфера (рН 5,5) и по 3 мл 2% раствора крахмала. Заготовленные пробирки помещают на водяную баню или в термостат, заранее нагретый до 40 °С. По достижении субстрата температуры 40 °С в пробирки приливают по 0,5 мл ферментного препарата, смесь осторожно перемешивают. Обязательно готовят контрольный вариант, в который вместо ферментного препарата добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. Затем смесь инкубируют 30 мин при 40 °С.

Через 30 мин в пробирки с реакционной смесью вносят по 2 мл 1 н раствора HCl для прекращения действия фермента, содержимое пробирок аккуратно перемешивают.

Затем из каждой пробирки берут по 0,5 мл смеси и вносят в мерные колбы на 50 мл, которые заранее до половины заполнены водой. В них же приливают по 1мл 0,1 н раствора HCl, 5 капель 0,3% раствора йода в 3% растворе йодистого калия. После доведения смеси до 50-ти мл водой, содержимое колб хорошо перемешивают.

Окрашивание смеси лучше проводить с интервалами 3 мин, для того, чтобы период от начала окрашивания до спектрофотометрирования (колориметрирования) для каждой колбы был примерно одинаковым. Спектрофотометрирование окрашенных растворов проводят при 595 нм (фотоколориметрирование – при красном светофильтре).

Для определения активности α -амилазы в 5–8 мл ферментного препарата добавляли на кончике шпателя сухого уксуснокислого кальция и ставили на водяную баню при 70⁰С, выдерживали 15 мин, затем быстро охлаждали. При таких условиях β -амилаза инактивируется практически полностью. Далее этот раствор использовали для определения α -амилазной активности по методике, описанной выше.

Активность амилаз (АА) (в 1 мг гидролизованного крахмала за 1 ч на 1 мл ферментативного раствора) рассчитали по формуле:

$$AA = \frac{E_k \cdot E_0}{E_k} \cdot \frac{2 \cdot 2}{60},$$

где E_k и E_0 - светопоглощение контрольного и опытного растворов, единиц шкалы прибора; 2 и 2—пересчетные коэффициенты на 1 ч и 1 мл ферментного раствора; 60 — пересчетный коэффициент на 1 мг крахмала (3 мл и 2%-го раствора соответствуют 60 мг) [Третьяков с соавт., 1990].

Материалы и оборудование. 1) спектрофотометр, центрифуга, ротатор, фарфоровые ступки с пестиками, водяная баня, колбы мерные емкостью 50 мл, 100 мл и 1л, конические колбы емкостью 100 мл, воронки, градуированные пипетки, пробирки;

2) 1% NaCl; 0,2 н ацетатный буфер с рН 5,5; 2% раствор крахмала; 1 н HCl; 0,1 н HCl;

3) проростки гороха, фасоли, ячменя, пшеницы или ржи.

Приготовление ацетатного буфера рН 5,5.

Для приготовления ацетатного буфера рН 5,5 необходимо взять 57,4 мл 1 н уксусной кислоты, прибавить 50,0 мл 1 н раствора NaOH и разбавить полученный раствор до 500 мл дистиллированной водой.

Определение активности протеиназ в прорастающих семенах

Протеолитические ферменты, протеазы, пептид-гидролазы – это ферменты класса гидролаз; содержатся во всех живых организмах, катализируют гидролиз пептидных связей в клеточных белках и белках пищи. Протеолитические ферменты делят на пептидазы (экзопептидазы) и протеиназы (эндопептидазы). Пептидазы гидролизуют преимущественно внешние пептидные связи в белках и пептидах, протеиназы – внутренние. В зависимости от особенностей строения активного центра протеолитические ферменты подразделяют на сериновые, тиоловые (цистеиновые), кислые протеиназы и металлоферменты, содержащие в активном центре атом металла (чаще Zn). К металлоферментам относится большинство известных пептидаз. Протеиназы различают также по субстратной специфичности, т. е. способности гидролизовать связи между определёнными аминокислотными остатками.

В растениях протеолитические ферменты содержатся как в вегетативных органах - листьях, стеблях, корнях, так и в покоящихся и

прорастающих семенах. Протеолитические ферменты выполняют разнообразные физиологические функции в растительных организмах, начиная с переваривания запасных белков семян до специфических регуляторных процессов, таких, как активация зимогенов, образование гормонов и других, биологически активных пептидов из их предшественников, транспорт белков, защитные реакции.

Принцип метода. В основу определения суммарной активности протеиназ положен метод, разработанный Ансеном и заключающийся в том, что ферментным препаратом, выделенным из растительного материала (семядолей прорастающих семян гороха, фасоли, бобов или прорастающих зерновок пшеницы и ржи), действуют на раствор какого-либо очищенного белка (казеина, альбумина, гемоглобина). Ферментную активность определяют по количеству высвободившихся из белков ароматических аминокислот (тирозина, триптофана) после удаления из раствора непрореагировавших с протеиназами белков и ферментного препарата.

Количество ароматических аминокислот, содержащихся в низкомолекулярных белках, пептидах и в свободном состоянии, определяют колориметрически с реактивом Фолина или на спектрофотометре при 280 нм. Принято считать (с определенной степенью условности), что активность протеиназ пропорциональна содержанию в растворе ароматических аминокислот.

Свойства белков, положенные в основу данного метода, служат хорошей иллюстрацией групповой специфичности протеиназ, заключающейся в том, что фермент катализирует расщепление определенных химических связей в отдельных группах близких; по строению веществ (протеиназы растений гидролизуют и белок животного происхождения).

Порядок работы. *Выделение протеиназ.* Взвешивают 4-5 г сырых семядолей или зерновок (навеска сухого материала около 1 г), помещают в ступку, добавляют немного кварцевого песка и тщательно растирают. Приливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают растирание до получения мелкодисперсной гомогенной кашицы. Навеску количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, ополаскивая пестик и ступку небольшими порциями воды. Объем жидкости в колбе доводят до 50 мл, суспензию перемешивают и оставляют настаиваться в течение 1 ч (периодически перемешивая) при 2-5 °С.

Затем содержимое колбы переносят в центрифужные пробирки (две пробирки по 20 мл), уравнивают их и вытяжку центрифугируют в течение 30 мин при 8000-10000 g. После этого надосадочную жидкость сливают в чистую колбу (препарат протеиназ) с притертой пробкой и при необходимости ставят в холодильник. Работу по определению активности протеиназ лучше проводить со свежим препаратом.

Приготовление растворов субстратов. В качестве субстратов для определения активности растительных протеиназ используют 2%-е растворы химически чистых препаратов казеина, альбумина или гемоглобина. Протеолитическая активность ферментов в семядолях двудольных и зерновках злаков обусловлена действием нескольких протеиназ, специфичных для каждого вида растений. Для функционирования отдельно взятой протеиназы необходимы специфические условия, в том числе и определенная реакция среды. Поэтому активность растительных протеиназ определяют при одинаковых температурном режиме и соотношении субстрат : фермент по массе, но при различных значениях pH.

Приготовление раствора казеина. Взвешивают 2 г порошка казеина, помещают в мерную колбу на 100 мл, приливают небольшими порциями, ополаскивая стенки воронки и горлышка колбы, около 80 мл 0,2 М фосфатного буфера с pH 8.0. Для растворения навески колбу ставят на водяную баню, нагретую до 30-40 °С. После растворения казеина содержимое колбы доводят буферным раствором до метки и тщательно перемешивают. Затем в отдельный стаканчик отливают 10 мл раствора и в нем проверяют pH. При необходимости доведения pH до заданной величины добавляют при интенсивном перемешивании несколько капель 1 н NaOH или 1 н HCl (по каплям). Затраченное количество щелочи или кислоты учитывается, и соответствующее их количество вносят в раствор казеина, оставшийся в колбе. Раствор субстрата вновь перемешивают.

Приготовление раствора гемоглобина с pH 3.0. Помещают 2 г порошка гемоглобина в фарфоровую ступку, приливают около 10 мл воды и тщательно растирают, строго следя, чтобы не было комочков и часть белка не осталась на стенках ступки и головке пестика. Затем раствор количественно переносят в стаканчик на 50 мл. Небольшой порцией воды ополаскивают ступку, пестик. Раствор гемоглобина в стаканчике подкисляют 0,3 н. HCl до pH 3.0, количественно переносят в

мерную колбу на 100 мл, доводят содержимое колбы до метки водой и тщательно перемешивают.

Приготовление раствора гемоглобина с рН 6.0. Помещают 2,2 г порошка гемоглобина в колбу на 150 мл и заливают 100 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 6.0. Колбу плотно закрывают пробкой и ставят в ротатор для перемешивания и растворения содержимого. После того как гемоглобин растворится (через 15-20 мин), колбу снимают с ротатора, вынимают пробку, в раствор вносят 36 г мочевины и оставляют при комнатной температуре на 30-40 мин, периодически перемешивая. После растворения мочевины в отдельно взятой пробе проверяют рН и при необходимости доводят до рН 6.0 растворами 1 н NaOH или 1 н HCl.

Определение активности протеиназ. В центрифужные пробирки на 10 мл, пронумерованные по порядку, наливают по 2 мл растворов субстратов: казеина с рН 8.0 или гемоглобина с рН 3.0 и рН 6.0, после чего пробирки помещают на 1...2 мин на водяную баню, предварительно нагретую до 30 °С. Когда раствор субстрата примет температуру бани, в пробирки вносят по 2 мл ферментного препарата, полученного из семян той или иной культуры в соответствии с заданием преподавателя. Реакция гидролиза белков идет 30 мин при 30 °С. Для равномерного прогревания содержимого пробирки периодически осторожно встряхивают.

Через 30 мин действие протеиназ останавливают добавлением в реакционную смесь 4 мл 10 %-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУК).

В трех пробирках готовят контрольные образцы. Для этого в них вносят по 2 мл соответствующих растворов субстратов (растворы казеина и гемоглобина с различными рН) и помещают на водяную баню.

Через 2 мин добавляют по 2 мл ферментативного препарата, встряхивают и вслед за этим в каждую приливают по 4 мл 10 %-го раствора ТХУК. Все остальные операции проводят, как и в опытных вариантах.

Пробирки с опытными растворами встряхивают и оставляют на водяной бане еще 30 мин для более полного осаждения непрореагировавших с протеиназами белков и самих ферментов. Пробирки снимают с водяной бани, осторожно насухо вытирают и уравнивают на рычажных лабораторных весах, добавляя при

необходимости в более легкие несколько капель 5 %-го раствора ТХУК. Затем пробирки помещают в ротатор центрифуги, центрифугируют 15 мин при 5000 g, ставят в штатив и приступают к спектрофотометрированию надосадочной жидкости. Параллельно определяют содержание белков в колбе, где находится ферментный препарат (так же, как суммарные белки в растительном материале). В качестве эталонного раствора берут дистиллированную воду. При определении измеряют светопоглощение и раствора субстрата. Спектрофотометрирование растворов проводят при 280 нм.

Активность протеиназ (АП) в условных единицах на 1 г навески за 1 ч рассчитывают по формуле:

$$\text{АП} = \frac{(E_0 - E_k) \cdot 2}{A_1},$$

где E_k и E_0 – светопоглощение контрольного и опытного образцов; A_1 – навеска материала, соответствующая количеству ферментного препарата, взятого для определения ($A_1 = \frac{A}{50}$, где A – навеска материала, взятая для анализа, г), г; 2 – коэффициент пересчета на 1 ч.

Материалы и оборудование. 1) спектрофотометр, центрифуга, ротатор, фарфоровые ступки с пестиками, водяная баня, колбы мерные емкостью 50 мл, 100 мл и 1л, конические колбы емкостью 100 мл, воронки, градуированные пипетки, пробирки;

2) казеин, гемоглобин, 0,2 М фосфатный буфер с рН 8,0, 1/15 М фосфатный буфер с рН 6,0; растворы 0,3 н HCl, 1 н NaOH, 5 %-й и 10 %-й ТХУК, 1 н HCl; мочевины.

3) проростки и проросшие семена гороха, фасоли, пшеницы или ржи, мука злаковых.

Приготовление 1/15 М фосфатного буфера рН 6,0.

Раствор А: 1/15 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,866 г в 1 л)

Раствор В: 1/15 М KH_2PO_4 (9,073 г в 1 л).

Буфер готовится смешиванием 12,1 мл раствора А + 87,9 мл раствора В.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большой практикум по биоэкологии. Ч. 1: Учеб. пособие / О.Л. Воскресенская, Е.А. Алябышева, М.Г. Половникова. – Йошкар-Ола, Изд-во: Мар. гос. ун-т. - 2006. – 107 с.

2. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 321–336.
3. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Вл.В. Кузнецов, В.В. Кузнецов, Г.А. Романов. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 487 с.
4. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. - М.: Колос, 1976. - 256 с.
5. Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков, Т.В. Карнаухова, Л.А. Паничкин. – М.: Агропромиздат, 1990. – 271 с.
6. Практикум по росту и устойчивости растений / В.В. Полевой, Т.В. Чиркова, Л.А. Лутова и др. – СПб.: Изд-во С.Петербурб. ун-та, 2001. - 212 с.
7. Степанченко Н.С., Новикова Г.В., Мошков И.Е. Количественное определение содержания белка // Физиология растений. 2011. Т.58. С.624-630.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
9. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.
10. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid // Anal. Biochem. 1985. V. 150. P. 76-85.
11. Gornall A.G., Bardawill C.S., David M.M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Method // J. Biol. Chem. 1949. V. 177. P. 751-766.
12. Wiechelman K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation // Anal. Biochem. 1988. V. 175. P. 231-237.
13. Layne E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins // Methods Enzymol. 1957. V. 3. P. 447-455.
14. Fasman G.D. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Boca Raton: CRC, 1989. 601 p.
15. Stoscheck C.M. Quantitation of Protein // Methods Enzymol. 1990. V. 182. P. 50-68.