

Выделение, очистка и изучение некоторых  
кинетических свойств альдолазы из мышц  
кролика.

Отчет за практикум по энзимологии

Студентов четвертого курса Мкртчян Гарика и Нагаева Бориса

2011

## Содержание

<b>1</b>	<b>Введение</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Приготовление веществ</b>	<b>6</b>
2.1	Доведение рН концентрированных растворов . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Выделение фермента из скелетных мышц кролика</b>	<b>6</b>
3.1	Введение в экстракцию . . . . .	7
3.2	Экстракция . . . . .	7
3.3	Фракционирование . . . . .	7
<b>4</b>	<b>Определение концентрации белка</b>	<b>8</b>
4.1	Спектрофотометрическое определение концентраций . . . . .	8
4.2	Введение в метод Брэдфорд . . . . .	9
4.3	Калибровка для метода Брэдфорд . . . . .	10
4.4	Определение концентраций белка методом Брэдфорд . . . . .	10
4.5	Обсуждение . . . . .	11
<b>5</b>	<b>Электрофорез</b>	<b>11</b>
5.1	Подготовка белков . . . . .	12
5.2	Разбавление белковых проб . . . . .	13
5.3	Приготовление образцов для электрофореза . . . . .	13
5.4	Маркеры для электрофореза: SM0671 . . . . .	13
5.5	Проведение электрофореза . . . . .	14
5.6	Вычисление массы выделенного белка . . . . .	14
<b>6</b>	<b>Определение активности альдолазы</b>	<b>16</b>
6.1	Измерение активности . . . . .	16
6.2	Определение активности при разных концентрациях альдолазы . . . . .	17
<b>7</b>	<b>Вычисление чистоты субстрата</b>	<b>19</b>
<b>8</b>	<b>Измерение <math>K_M</math></b>	<b>20</b>
<b>9</b>	<b>Выводы</b>	<b>24</b>

## Список таблиц

1	Концентрация белка, определенная спектрофотометрическим способом	9
2	Концентрация белка, определенная способом Брэдфорд . . . . .	11
3	Концентрации белка, определенные разными методами . . . . .	11
4	Объемы, отбираемые для электрофореза из проб, разбавленных в 5 раз	13
5	Состав пробы 5 $\mu g$ . . . . .	13
6	Скорость изменения оптической плотности . . . . .	17
7	Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата . . . . .	21
8	Значения $K_M$ и $V_M$ . . . . .	21

## Список иллюстраций

1	Реакция, проводимая фруктозодифосфатальдолозой . . . . .	5
2	Пространственная структура альдолазы А из мышц кролика . . . . .	5
3	Краситель Coomassie Brilliant Blue G-250 . . . . .	9
4	Сдвиг максимума поглощения после связывания Coomassie с белком . .	10
5	Калибровка для метода Брэдфорд . . . . .	10
6	Результаты электрофореза . . . . .	15
7	Определение молекулярной массы выделенного белка . . . . .	15
8	Зависимость оптической плотности от времени . . . . .	18
9	Зависимость изменения оптической плотности от времени . . . . .	18
10	Зависимость скорости от содержания альдолазы . . . . .	19
11	Схема разбавления бисфосфата для измерения $K_M$ . . . . .	20
12	Кинетический график. Прямые координаты. . . . .	22
13	Кинетический график. Координаты Лайнуивера-Берка. . . . .	22
14	Кинетический график. Координаты Хэйкса. . . . .	23
15	Кинетический график. Координаты Еди-Хофсти. . . . .	23

## Список обозначений

Da    Дальтон

M    моль/литр

mg    миллиграмм

ml    миллилитр

$\mu$ g    микрограмм

$\mu$ l    микролитр

альдолаза    фруктозодифосфатальдолоза

бисфосфат    фруктозо-1,6-дифосфат

# 1 Введение

Фермент фруктозодифосфатальдолаза (ЕС 4.1.2.13) катализирует обратимое расщепление фруктозо-1,6-дифосфата между  $C_3$  и  $C_4$  с образованием диоксиацетонфосфата и глицеральдегидфосфата. Равновесие сильно сдвинуто в направлении обратной реакции. Данная реакция является частью гликолиза. Также фермент участвует в гликонеогенезе; было доказано, что иногда он может функционировать как адапторный белок.

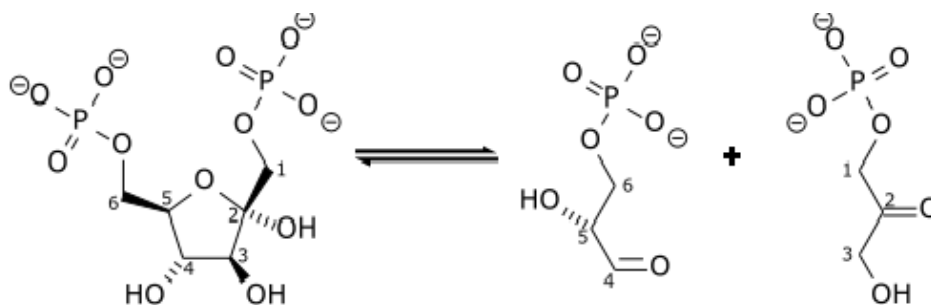


Рис. 1. Реакция образования глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата

Фермент представляет собой тетрамер, состоящий из 4 одинаковых субъединиц (162kDa = 4 · 40.5kDa). Животные ткани содержат по меньшей мере три различные альдолазы, характерные для мышц, печени и мозга (А, В, С).

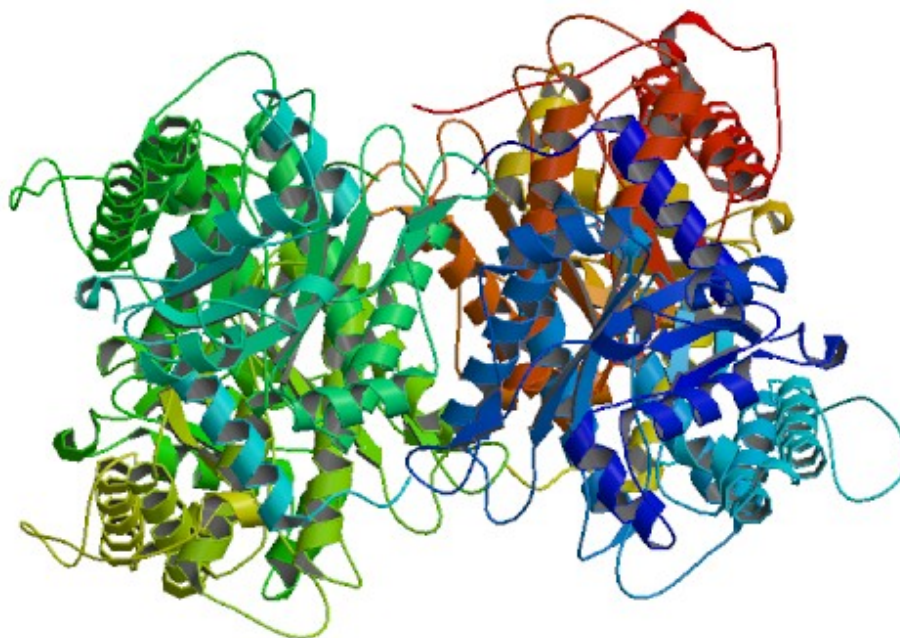


Рис. 2. Пространственная структура альдолазы А из мышц кролика, рисунок был взят из банка данных PDB, код - 1ZAH

А, В, С кодируются тремя разными генами и по-разному экспрессируются в течение развития организма [1] [2]. Альдолазы А и С были найдены в тканях взрослых

животных.

*Кинетические параметры:* для человека константа Михаэлиса  $K_m=52 \mu\text{M}$  для фруктозо-1,6-бисфосфата [3].

*Изоэлектрическая точка:* 6.1 [4]

## 2 Приготовление веществ

Были приготовлены и убраны в холодильник следующие вещества:

1. Сульфат аммония, насыщенный раствор, рН 7.5
2. ЭДТА динатриевая соль, 5 мМ раствор, рН 7.5
3. 5% раствор аммиака (готовят из концентрированного аммиака, 25%)
4. расвор сульфата аммония со степенью насыщения 0.52, приготовленный на 5%-ном растворе аммиака
5. расвор сульфата аммония со степенью насыщения 0.5, приготовленный на 25 мМ глицил-глициновом буфере, рН 7.5

### 2.1 Доведение рН концентрированных растворов

В некоторые растворы нельзя погружать электрод рН-метра, так как эти растворы настолько концентрированы, что полученное значение рН будет неточным, а электрод может быть попорчен. Чтобы довести рН таких растворов до требуемого значения:

1. отобрать небольшую пробу, например, 2 ml
2. разбавить в 20 раз
3. погрузить электрод
4. довести рН до требуемого, прикапывая кислоту или щелочь
5. чтобы довести рН исходного раствора, следует добавить  $\frac{2}{3} \frac{V}{2\text{ml}} V_a$  кислоты или щелочи ( $\frac{2}{3}$  – эмпирическая величина), где:  $V$  – объем исходного раствора,  $V_a$  – объем добавленной кислоты или щелочи

## 3 Выделение фермента из скелетных мышц кролика

Работу проводили во льду. Низкие температуры были необходимы, чтобы уменьшить активность протеаз, чтобы избежать инактивации целевого фермента. По той же причине использовался раствор ЭДТА (см. 3.2).

### 3.1 Введение в экстракцию

Исследование уникального метаболомного профиля системы, т.е его метаболического состава, является одной из актуальных задач, решаемых метаболомикой. Достижение этой цели требует экстракции и количественного определения максимального количества метаболитов в тканях [5]. Современные методы измельчения тканей обычно сочетают с одновременной экстракцией белков из гомогенатов тканей. Большинство белков тканей хорошо растворимо в 8-10% растворах солей. При экстракции белков широко применяют различные буферные смеси с определенными значениями рН среды, органические растворители, а также неионные детергенты – вещества, разрушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами и между белковыми молекулами.

Из органических соединений, помимо давно применяемых водных растворов глицерина, широко используют (особенно для солюбилизации) слабые растворы сахарозы. На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает рН среды, поэтому в белковой химии применяют фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси со значениями рН от кислых до слабощелочных, которые способствуют как растворению, так и стабилизации белков. Для выделения белков сыворотки крови используют способы их осаждения этанолом, ацетоном, бутанолом и их комбинации. Почти все органические растворители разрывают белок-липидные связи, способствуя лучшей экстракции белков [6].

### 3.2 Экстракция

100 g мышц кролика было разрезано ножом и ножницами на фрагменты, длина которых не превышала 5 мм. В гомогенизатор с металлическими ножами было добавлено 150 ml ЭДТА, 5 mM, рН 7.5. После этого фрагменты мышцы поместили в гомогенизатор и измельчали до тех пор, пока вещество в гомогенизаторе не стало похоже на кашу.

Смесь была перемещена в стакан, после чего добавили ещё 75 ml охлажденного 5 mM ЭДТА, рН 7.5, и перемешали в течение 10 минут. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали (20 минут при 18000 g). Супернатант собрали. Объем супернатанта составил 240 ml. Из супернатанта отобрали 500 мкл для анализов (*проба 1*).

### 3.3 Фракционирование

рН супернатанта был доведен до 7.5, со степенью насыщения 0.5. Для этого был добавлен равный объем (240 ml) холодного 5%-ный аммиака с помощью делительной воронки, при интенсивном перемешивании в течении 30 минут. После этого оставили на 15 минут на холоде.

Затем раствор центрифугировали (20 минут при 18000g). Супернатант собрали. Объем супернатанта составил 430 ml. Из супернатанта отобрали 500 мкл для анализов (*проба 2*).

Супернатант довели до степени насыщения 0.52 добавлением насыщенного раствора сульфата аммония, рН 7.5 (4 ml на каждые 100 ml раствора). рН довели до 8.0

с помощью раствора сульфата аммония со степенью насыщения 0.52, приготовленного на 5%-ном растворе аммиака. Данный раствор мог повредить электрод, поэтому придерживались техники доведения pH концентрированных растворов (см. 2.1).

Раствор оставили на сутки в холодильнике, ожидая появления кристаллов.

Однако кристаллы альдолазы так и не выпали. Чтобы получить кристаллы, раствор довели до комнатной температуры, после чего поставили в холодильник. Раствор помутнел.

Затем раствор центрифугировали (20 минут при 30000g). Объем супернатанта составил 410 ml. Из супернатанта отобрали 500 мкл для анализов (*проба 3*). Осадок перенесли в стеклянный стаканчик путем суспендирования осадка в растворе сульфата аммония со степенью насыщения 0.5, приготовленного на 25 mM глицил-глициновом буфере, pH=7.5. Затем осадок, содержащий альдолазу, поместили в холодильник (*проба 4*). Объем осадка составил примерно 8 ml.

## 4 Определение концентрации белка

### 4.1 Спектрофотометрическое определение концентраций

Метод основан на способности ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и в меньшей степени фенилаланина) поглощать ультрафиолетовый свет при 280 нм. Поскольку белки отличаются по содержанию ароматических аминокислот, их поглощение в ультрафиолетовой области спектра может сильно различаться. Измеряя величину оптической плотности при этой длине волны, определяют количество белка в растворе. Использование данного метода позволяет проводить определение белка быстро и не требует использования дополнительных реагентов.

$$A_{280} = \epsilon cl$$

Проверяли, что  $0.1 < A_{280} < 1$ .

Для всех проб действовали по следующей схеме:

1. набирали 2 ml бидистиллированной воды в кювету
2. обнуляли прибор
3. доливали 50  $\mu$ l раствора из пробы (данное количество было подобрано, чтобы разведение составило 41).
4. снимали значение  $A_{280}$

Таким образом, разведение равно 41. Было допущено, что удельное поглощение  $\epsilon = 1$  для белка. Для пробы 4 было использовано литературное значение  $\epsilon = 0.91$ . Толщина кюветы  $l = 1$  см. Таким образом, концентрация белка в пробе равна:  $c = 41 \cdot A$  [mg/ml].

Концентрации, определенные спектрофотометрическим методом, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация белка, определенная спектрофотометрическим способом

Проба	A	C[mg/ml]
1	0.49	20
	0.54	22
2	0.177	7.257
	0.2	8.2
3	0.154	6
4	0.148	32.7

## 4.2 Введение в метод Брэдфорд

Метод Брэдфорд – один из колориметрических методов количественного определения белков в растворе (особенно с низкой концентрацией). Данный метод основан на связывании белками красителя Coomassie Brilliant Blue G-250 [7]. Механизм связывания Coomassie заключается во взаимодействии анионной формы красителя с белком [8].

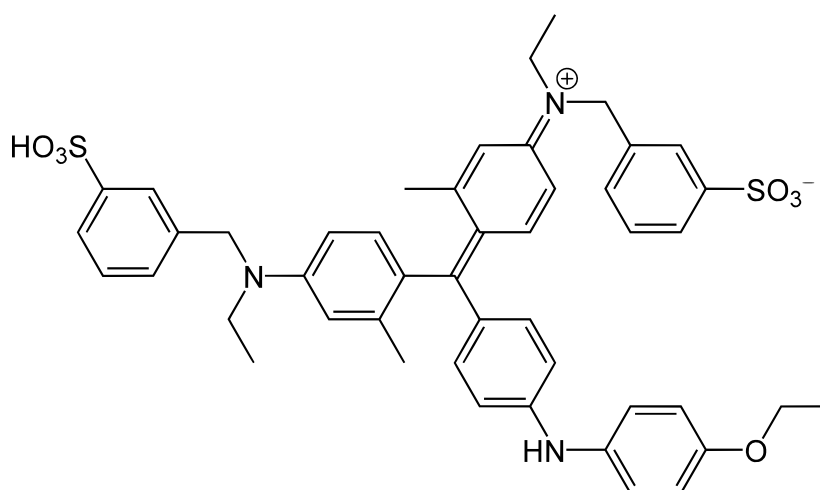


Рис. 3. Краситель Coomassie Brilliant Blue G-250

Связывание с белком осуществляется за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками белка. Связывание красителя Coomassie происходит преимущественно с аргининовым остатком и в меньшей степени с остатками гистидина, лизина, тирозина, триптофана и фенилаланина. Количество связей, образуемых между Coomassie и белком, зависит от количества положительно заряженных групп, расположенных в молекуле белка. Считается, что 1.5-3 молекулы красителя связываются одной положительно заряженной группой [9]. Исходный кислый раствор Coomassie имеет максимум поглощения при длине волны 465 нм. После связывания с белком и изменения окраски максимум поглощения смещается к 595 нм (рисунок 4).



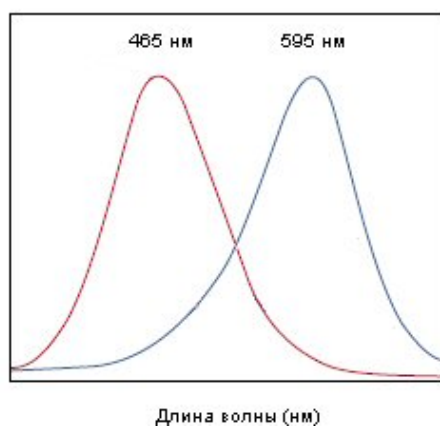


Рис. 4. Сдвиг максимума поглощения после связывания Coomassie с белком

### 4.3 Калибровка для метода Брэдфорд

Состав пробы: 1.9 ml Брэдфорд, буфер и БСА с концентрацией 0.4 mg/ml.

Под экспериментальные данные была подогнана линейная зависимость (рисунок 5).

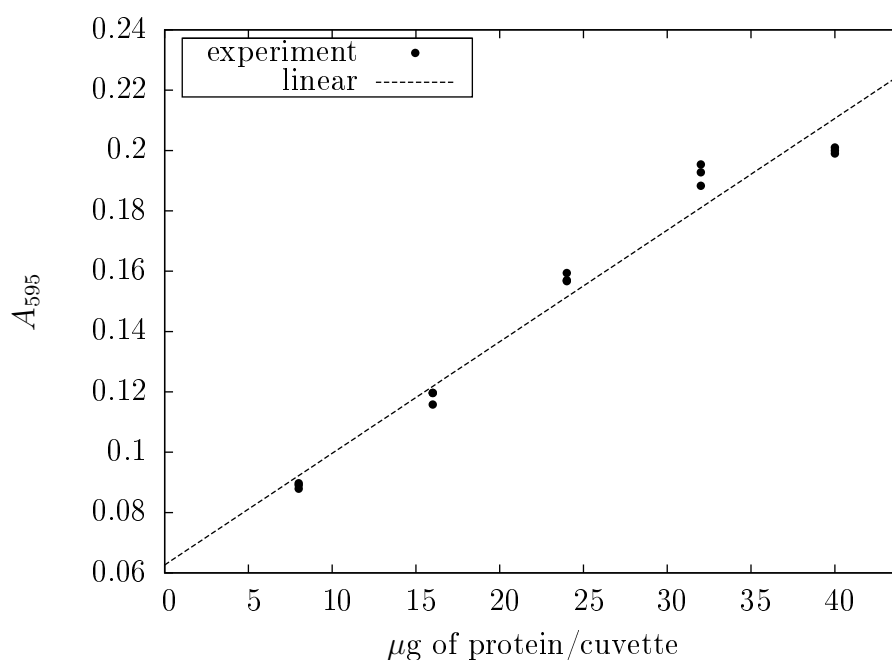


Рис. 5. Калибровка для метода Брэдфорд. На графике показана зависимость  $A_{595}$  от содержания белка в кювете

### 4.4 Определение концентраций белка методом Брэдфорд

Учитывая примерные концентрации, полученные спектрофотометрическим методом, раствор из проб развели так, чтобы количество белка лежало в пределах калибровочной кривой (0.1 – 0.2).

Концентрация белка в пробе (mg/ml):

$$c = \frac{m \cdot N}{V_c}$$

где  $m$  – содержание белка в кювете ( $\mu\text{g}$ ),  $N$  – разведение,  $V_c$  – объем кюветы (2 ml).

Концентрации, определенные методом Брэдфорд, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация белка, определенная способом Брэдфорд

Проба	C[mg/ml]
1	15.6
2	17.6 25.1
3	6.2

## 4.5 Обсуждение

После рассмотрения концентраций проб, полученных спектрофотометрическим методом и методом Брэдфорд, было обнаружено, что точность концентрации пробы 2 вызывает сомнения.

Значения концентрации пробы 3, полученные обоими методами, почти совпали (6 mg/ml). Концентрация пробы 1 принята за 15.6 mg/ml. Концентрация пробы 2 должна быть меньше концентрации пробы 1 (уже потому, что объем, из которого отбиралась проба 1, меньше объема, из которого отбиралась проба 2). В то же время, концентрация пробы 2 должна быть больше концентрации пробы 3, так как проба 3 отбиралась из раствора, из которого была удалена альдолаза. Учитывая эти соображения, решили грубо округлить концентрацию пробы 2. Для дальнейших расчетов использовали значение 10.8 mg/ml.

Измерения концентраций собраны в таблице 3.

Таблица 3. Концентрации белка, определенные разными методами

Проба	C[mg/ml]		
	метод Брэдфорд	спектрофотометрический метод	Оценка
1	15.6	20, 22	15.6
2	17.6, 25.1	7.3, 8.2	10.8
3	6.2	6	6.2
4	–	32.7	32.7

## 5 Электрофорез

В данном разделе использовались материалы из методического пособия по генной инженерии.

Электрофорез по Лэммли является одним из наиболее популярных методов по работе с белками. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле, белки можно

фракционировать по молекулярной массе, размерам и форме, так как данный метод имеет большую разрешающую способность. Преимущества данного метода следующие: гель химически стабилен, нет электроосмоса, устойчивость к растворителям, изменению pH и температуре.

Процесс полимеризации полиакриламидного геля представляет собой химическую реакцию, мономером которой служит акриламид. Так как реакция протекает по радикальному механизму, то в качестве молекулы-инициатора служит персульфат аммония (ПСА). Полимеризация начинается с образования радикала из ПСА. Катализатором процесса служит тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Первая реакция инициирует разрыв связи между двумя атомами кислорода в молекуле персульфата аммония. В результате этой реакции образуется свободный радикал с одним несвязанным электроном у атома кислорода. Данный радикал влияет на разрыв двойной связи в молекуле акриламида. Такая цепная реакция продолжается, пока два радикала не образуют между собой ковалентную связь.

## 5.1 Подготовка белков

Так как многие белки имеют вторичную, третичную и иногда четвертичную структуру, то следует их предварительно денатурировать, чтобы избежать влияния структуры и заряда белка на его подвижность в геле. Для этого их кипятят в Sample Buffer (SB). Это буфер, который включает краситель бромфеноловый синий (позволяет нам следить за ходом процесса), глицерин (облегчает нанесение образца на гель), SDS и  $\beta$ -меркаптоэтанол. SDS – это ионный детергент (додецилсульфат натрия), который за счет гидрофобных взаимодействий связывается с белками в соотношении 1,4 мг SDS на 1 мг белка. Так как в растворе образуется избыток диссоциированных остатков сульфокислоты, собственный заряд белка становится несущественным.  $\beta$ -меркаптоэтанол способствует разрыву дисульфидных связей в молекуле белка. Денатурации белка также способствует кипячение. Из этого можно сделать вывод, что в полиакриламидном геле разделение белков идет только по массе.

Одна из особенностей данной системы ЭФ заключается в том, что участвуют 2 геля – разделяющий (мелкопористый, нижний) и концентрирующий (крупнопористый, верхний). Кроме размеров пор, эти гели отличаются по pH. В концентрирующем геле разделение белков не происходит. В нем белки собираются в одну узкую полосу. Для разделяющего геля эта полоса будет стартом для начала фракционирования. Смысл процесса заключается в следующем: сразу после включения электрического напряжения, напряженность электрического поля одинакова по всему гелю. Образцы начинают входить в гель. Ионы глицина в концентрирующем геле имеют отрицательный заряд и начинают замещать ионы хлора. Следовательно, в концентрирующем геле (с более кислым pH) большинство молекул глицина изменяют заряд на нейтральный. Такая нейтрализация увеличивает напряженность электрического поля в концентрирующем геле и образцы начнут двигаться. В разделяющем геле можно наблюдать обратное изменение напряженности поля. Это приведет к замедлению движения белков. С этого момента начнется медленное разделение белков под воздействием низкой напряженности электрического поля.

## 5.2 Разбавление белковых проб

Масса, которую можно поместить на дорожку, равна  $5 \mu\text{g}$ . Объем, помещаемый на дорожку, равен  $10 \mu\text{l}$ . Следовательно, для использования пробы в электрофорезе концентрация белка должна быть примерно  $0.5 \text{ mg/ml}$ . Объем образца для электрофореза:  $200 \mu\text{l}$ . Было решено сначала разбавить все пробы в 5 раз, после чего отобрать из них объем, необходимый для электрофореза.

Чтобы получить образец с концентрацией  $0.5 \text{ mg/ml}$ , из раствора, полученного разбавлением пробы в 5 раз, необходимо отобрать

$$V = N \frac{C_2 V_2}{C_1} = 5 \frac{0.5 \text{ mg/ml} \cdot 0.2 \text{ ml}}{C_1} = \frac{0.5}{C_1} [\text{ml}]$$

где  $C_1$  – концентрация белка в пробе.

Концентрации проб были рассчитаны в предыдущих опытах (смотри таблицу 3). Рассчитаем объемы, которые нужно отбирать из разбавленных в 5 раз проб (таблица 4).

Таблица 4. Объемы, отбираемые для электрофореза из проб, разбавленных в 5 раз

Проба	$C_1$ [mg/ml]	$V$ [ $\mu\text{l}$ ]
1	15.6	32.05
2	10.8	46.3
3	6.2	80.65
4	32.7	18.7

## 5.3 Приготовление образцов для электрофореза

4-х кратный буфер для образцов (SB) был выдан преподавателем. Для получения однократного буфера, 4-х кратных буфер был разбавлен в 4 раза. В 1 мл SB было добавлено  $50 \mu\text{l}$  меркаптоэтанола, концентрация меркаптоэтанола в полученном буфере 5%. Для получения образцов для электрофореза сначала добавляли воду, затем пробу белка, разведенную в 5 раз, затем  $50 \mu\text{l}$  SB. Смотри таблицу 5.

Таблица 5. Состав пробы  $5 \mu\text{g}$

Проба	$\text{H}_{20}$	Проба/5	SB
1	118	32	50
2	104	46	50
3	70	80	50
4	131	18.7	50

## 5.4 Маркеры для электрофореза: SM0671

1. 170 kDa
2. 130 kDa

3. 95 kDa
4. 72 kDa – красный
5. 55 kDa
6. 43 kDa
7. 34 kDa
8. 26 kDa
9. 17 kDa
10. 10 kDa – желтый

### 5.5 Проведение электрофореза

В 10 лунок геля были нанесены образцы:

1. маркер
2. проба 1 (8  $\mu$ l, 4  $\mu$ g)
3. проба 2 (8  $\mu$ l, 4  $\mu$ g)
4. проба 3 (8  $\mu$ l, 4  $\mu$ g)
5. проба 4 (8  $\mu$ l, 4  $\mu$ g)
6. пустая
7. маркер

Параметры электрофореза: 20 mA, 400 V.

Результат электрофореза – смотри рисунок 6.

### 5.6 Вычисление массы выделенного белка

Выделенный белок немного легче маркера 6, имеющего молекулярную массу 43 kDa. Был построен график (рисунок 7), с помощью которого была выяснена молекулярная масса белка: 40.9 Da. Данное значение согласуется с литературными данными (см. 1).

*Вывод:* последняя стадия эффективно отделила альдолазу.

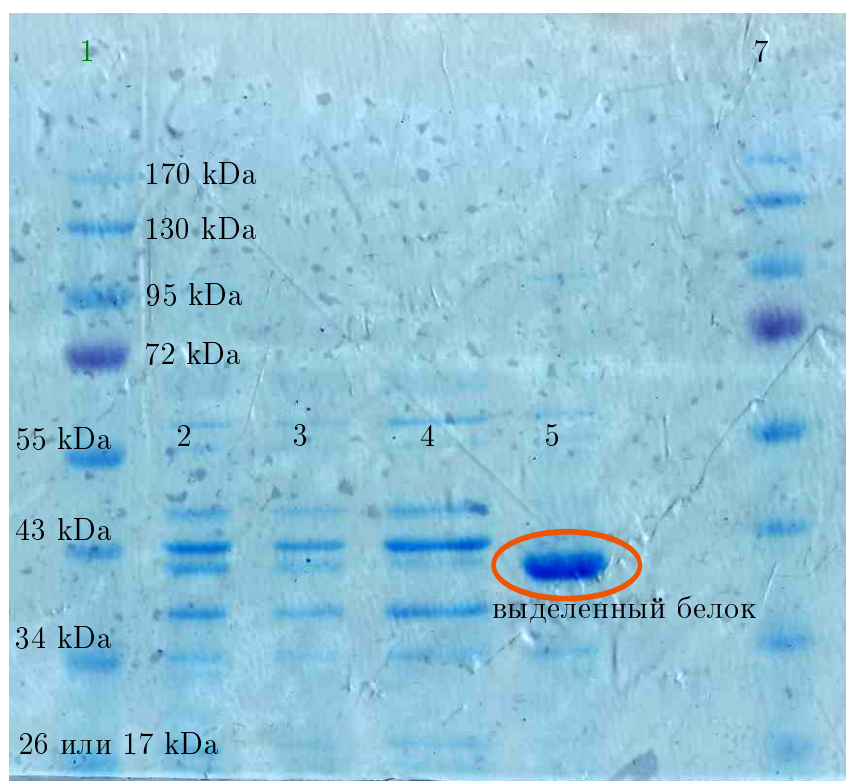


Рис. 6. Результаты электрофореза

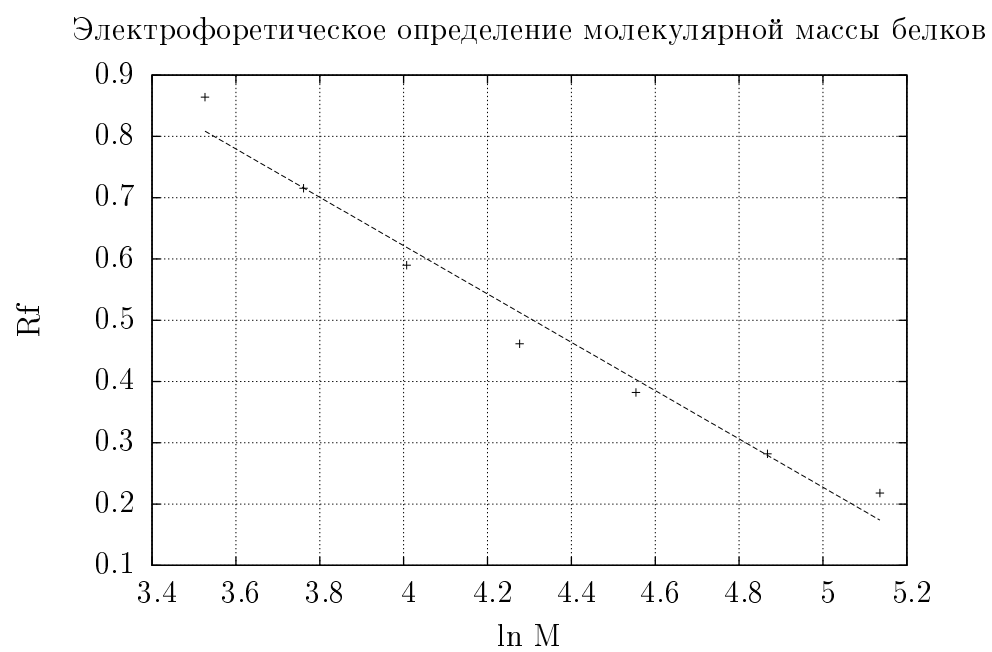
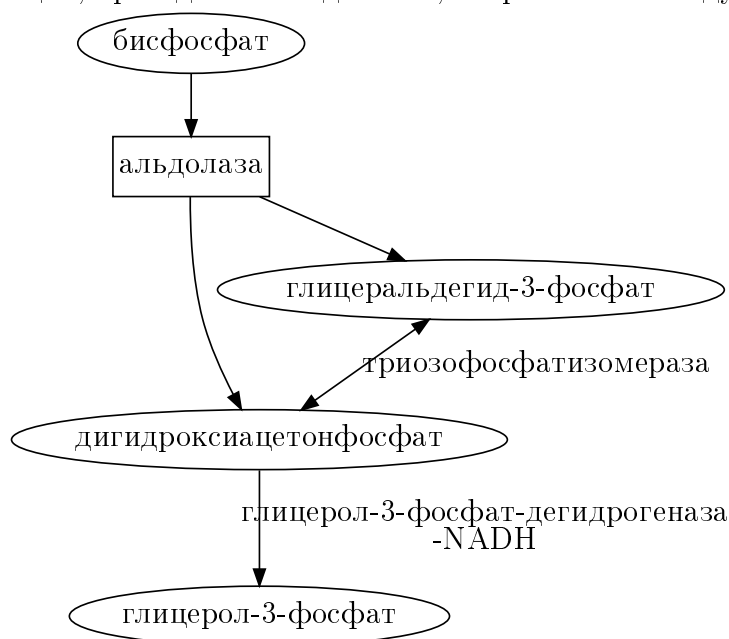


Рис. 7. Определение молекулярной массы выделенного белка

## 6 Определение активности альдолазы

Реакция, проводимая альдолазой, сопряжена со следующими реакциями:



Измерять активность удобно по изменению концентрации NADH, которое можно детектировать по изменению оптической плотности.

### 6.1 Измерение активности

Список реактивов:

1. Глицил-глициновый буфер (0.05M, pH 7.5)
2. NADH (0.02M)
3. Соль фруктозобисфосфата (0.075M)
4. Коммерческий препарат ферментов, содержащий триозофосфатизомеразу и глицерол-3-фосфат-дегидрогеназу. Концентрация рабочего раствора составила 6.3 mg/ml. Активность глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы: 150 E/ml. Активность триозофосфатизомеразы: 1.6 E/ml. Раствор был приготовлен на 50 mM глицил-глициновом буфере.
5. Фруктозобисфосфатальдолаза (раствор на 50 mM глицил-глициновом буфере). Концентрации приведены в таблице 3, в разных измерениях использовали разные объемы, смотри ниже.

Для измерения активности значения  $A_{340}$  снимают каждые 30 секунд в течении как минимум 3 минут.

1. добавить 1.9 ml глицил-глицинового буфера
2. 25  $\mu$ l вспомогательных ферментов

3. альдолаза (использовали разные объемы, смотри ниже)
4. поместить кювету в прибор и обулить
5. добавить 15  $\mu\text{l}$  NADH
6. добавить бисфосфат на палочке и перемешать этой же палочкой
7. запустить прибор

При измерения активности изменяли объем вносимой альдолазы, при измерения  $K_M$  – объем бисфосфата (субстрата альдолазы). При измерения активности объем добавляемого бисфосфата оставался постоянным (60  $\mu\text{l}$ ).

## 6.2 Определение активности при разных концентрациях альдолазы

Была проведена серия экспериментов (см. 6.1). При этом концентрация субстрата оставалась постоянной и составила 60  $\mu\text{l}$ . Причины, по которым было выбрано данное значение, следующие. Литературное значение  $K_M = 52\mu\text{M}$ . При добавлении бисфосфата в кювету его концентрация снижалась в  $\frac{2000}{60} = 33$  раз. Исходная концентрация бисфосфата равна 75 мМ. Значит, концентрация бисфосфата в кювете около  $\frac{75}{33} = 2.3$  мМ, что намного превышает  $K_M$ . Так как насыщающей концентрацией можно считать концентрацию 10–20  $K_M$ , используемая концентрация наверняка являлась насыщающей.

Используемые объемы (разбавленной) альдолазы: 20  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  и 5  $\mu\text{l}$ . Показания прибора снимались в течении 5 минут. Полученные зависимости представлены на рисунке 8.

Зависимости пересчитали для  $\Delta D$ , которое пропорционально количеству израсходованного субстрата.  $\Delta D$  рассчитывали, как разность исходного и текущего значений  $D$ . Кроме того, рассматривали зависимость, спустя 2 минуты от начала отсчета, так как до 2 минут реакция находится в лаг-фазе. Полученные зависимости представлены на рисунке 9.

Зависимости спрямили. Значения  $\frac{\Delta D}{\text{min}}$  приведены в таблице 6.

Таблица 6. Скорость изменения оптической плотности при разных объемах альдолазы

$V_{\text{альдолазы}}$	$\Delta D/\text{min}$
20	0.172
10	0.087
05	0.045

На рисунке 10 представлен график, построенный по данным точкам.

Содержание (в мг) альдолазы в кювете можно получить по следующей формуле:

$$\frac{1}{100} V_{\text{альдолазы}} \cdot C = \frac{1}{100} V_{\text{альдолазы}} \cdot 32.7\text{mg/ml}$$

После спрямления зависимости выяснилось, что  $\frac{\Delta D}{\text{min}\cdot\text{mg}} = 25.9$  (тангенс угла наклона прямой на рисунке 10).



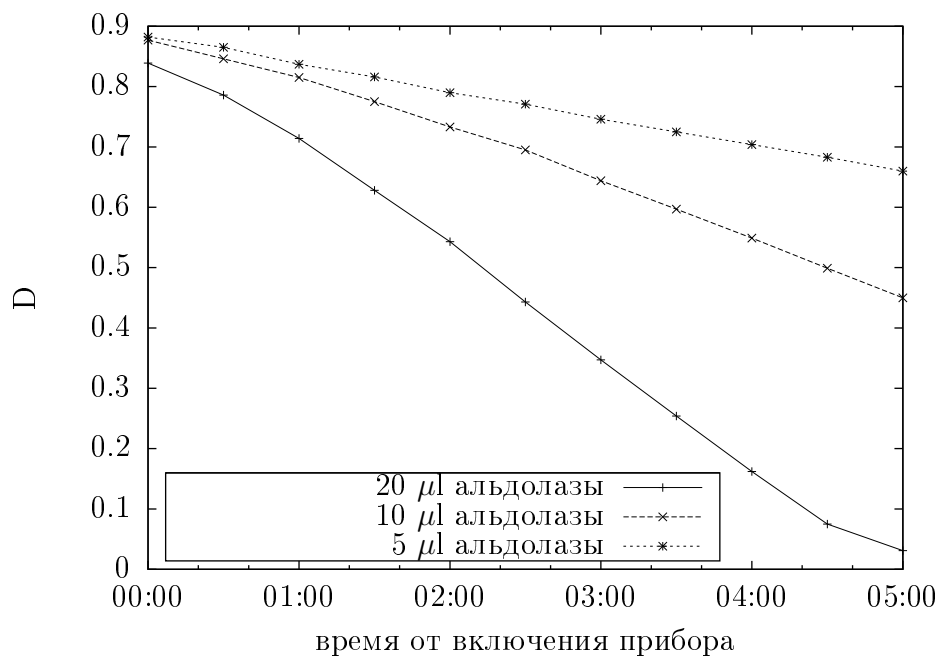


Рис. 8. Зависимость оптической плотности от времени при разных концентрациях альдолазы

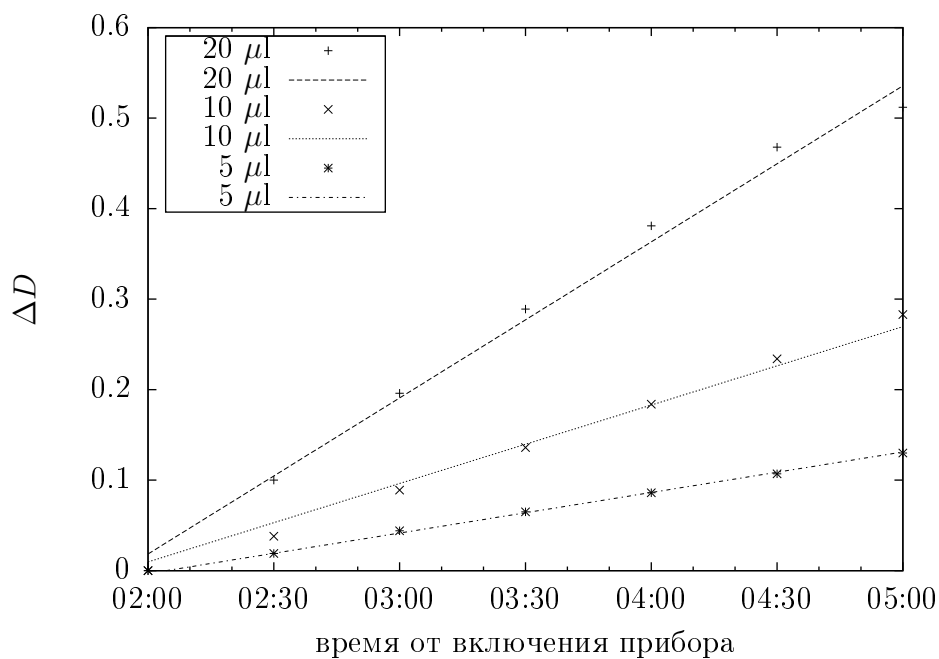


Рис. 9. Зависимость изменения оптической плотности от времени при разных концентрациях фермента. Точкам соответствуют экспериментальные данные, а прямым – аппроксимация. В качестве подписей приведены объемы альдолазы.

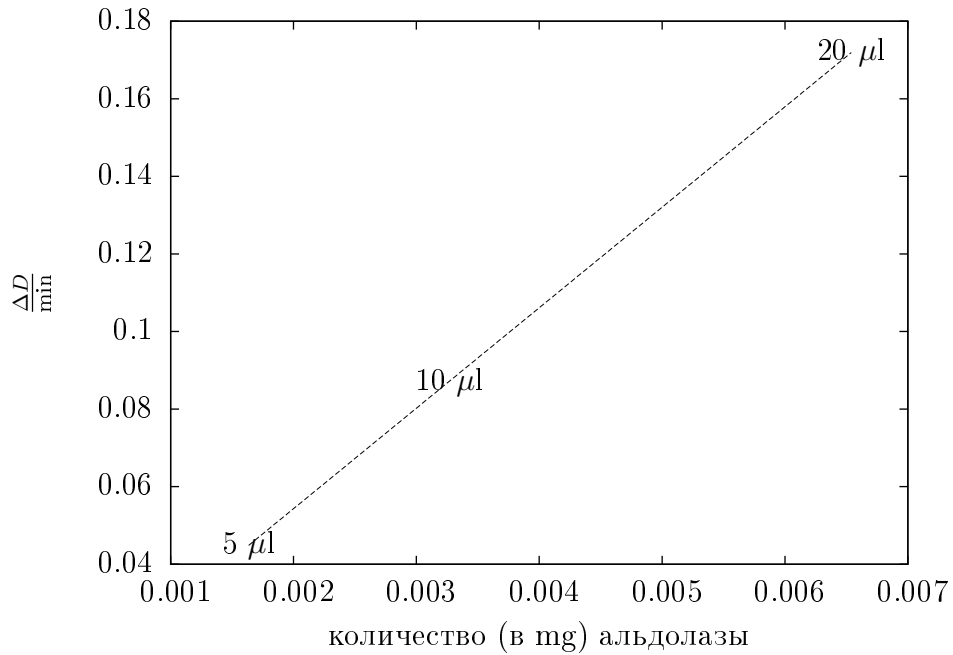


Рис. 10. Зависимость скорости изменения оптической плотности от содержания альдолазы. Объемы альдолазы (20, 10 и 5  $\mu\text{l}$ ) отмечены внутри графика. Эти точки соответствуют экспериментальным данным. Через них была проведена прямая с помощью аппроксимации. То, что точки лежат на одной прямой, говорит о непротиворечивости данных.

Вычислим активность альдолазы:

$$E = \frac{1}{2} \frac{\Delta D_{340} \cdot V}{\text{min} \cdot 6.22 \cdot \text{mg альдолазы}} = \frac{1}{2} 25.9 \cdot \frac{2 \text{ ml}}{6.22} = 4.2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}}$$

$\frac{1}{2}$  в формуле, так как на одну израсходованную молекулу субстрата расходуется две молекулы NADH.

Активность альдолазы довольно высока, что подтверждает высокое качество проведенного выделения.

## 7 Вычисление чистоты субстрата

Чтобы вычисление константы Михаэлиса было более точным, провели эксперимент для вычисления чистоты субстрата. Для этого измерили  $A$  сразу после добавления NADH, до добавления субстрата. Значение  $A$  составило 0.805.

Количество добавленного субстрата: 10  $\mu\text{l}$ , разбавление в 10 раз.

Значение  $A$  стало снижаться, после чего вышло на плато на уровне 0.5.

$$\Delta D = 0.305$$

$$\Delta \nu \text{NADH} = \frac{\Delta D \cdot V_{\text{куветы}}}{6.22} = 0.098 \mu\text{mol}$$

$$\nu S = \frac{1}{2} \Delta \nu \text{NADH} = 0.049 \mu\text{mol}$$

$\frac{1}{2}$  в формуле, так как на одну израсходованную молекулу субстрата расходуется две молекулы NADH.

$$C_{S \text{ в кювете}} = \frac{\nu S}{V_{\text{кюветы}}} = \frac{0.049}{2} = 0.0245 \text{mM}$$

$$C_S = C_{S \text{ в кювете}} \cdot N = 0.0245 \text{M} \cdot 200 \cdot 10 = 49 \text{mM}$$

$$\text{чистота} = \frac{49 \text{mM}}{75 \text{mM}} = 0.65 (65\%)$$

## 8 Измерение $K_M$

Была проведена серия экспериментов, описанных в 6.1. При этом количество альдолазы оставалось постоянным ( $10 \mu\text{l}$ , разбавленная в 100 раз), а количество бисфосфата изменялось.

Схема разбавления бисфосфата представлена на рисунке 11

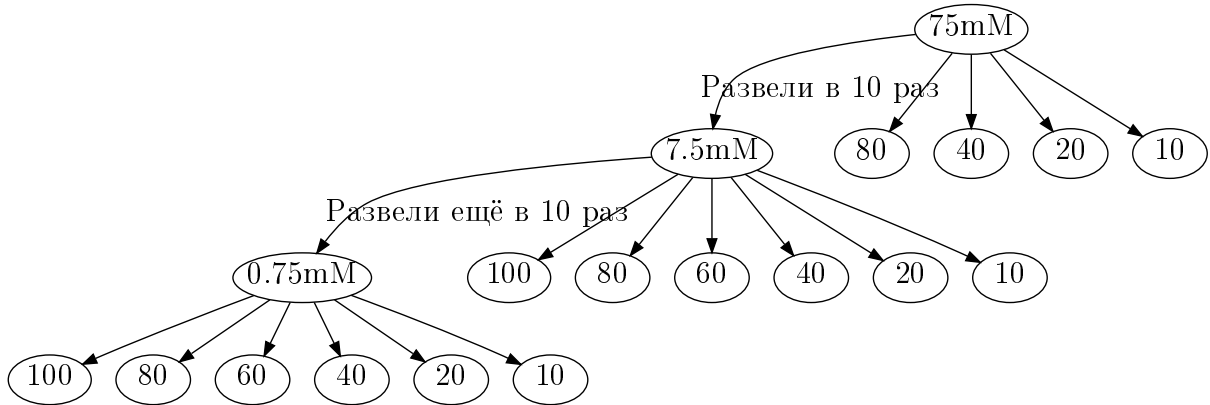


Рис. 11. Схема разбавления бисфосфата для измерения  $K_M$ . На схеме отмечены отбираемые объемы (в  $\mu\text{l}$ ) и концентрации полученных растворов (в mM).

Когда  $K_M$  измеряли в первый раз, оказалось, что полученные данные слишком шумные, только 3 точки пришлось на «спуск» графика Михаэлиса-Ментен. Поэтому измерение  $K_M$  было переделано.

Действовали по прежней схеме, но:

1. сначала провели измерения при самых больших и самых низких концентрациях субстрата, после чего придерживались бинарного поиска. По-видимому, благодаря этому удалось избежать длительного изучения точек на плато;
2. подогрели буфер;
3. использовали натриевую соль фруктозобисфосфата ( $M = 340 \text{ Da}$ ) (см 6.1).

В таблице 7 представлена зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (бисфосфата).

Значение  $A$  трех последних точек слишком низкое. Эти точки были исключены из дальнейшего рассмотрения. На рисунках 12, 13, 14 и 15 представлена зависимость

Таблица 7. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

S [ $\mu\text{M}$ ]	V [ $\Delta D/\text{min}$ ]	V [ $\mu\text{mol S}/\text{min}$ ]	V [ $\mu\text{mol NADH}/\text{min}$ ]
2437	0.062	0.00997	0.01994
1462	0.061	0.00980	0.01961
243.7	0.060	0.00964	0.01929
121.8	0.059	0.00948	0.01897
60.93	0.052	0.00836	0.01672
24.37	0.045	0.00723	0.01447
18.2	0.041	0.00659	0.01318
12.18	0.035	0.00562	0.01125
8.531	0.021	0.00337	0.00675
6.097	0.011	0.00177	0.00354
2.437	0.004	0.00064	0.00129

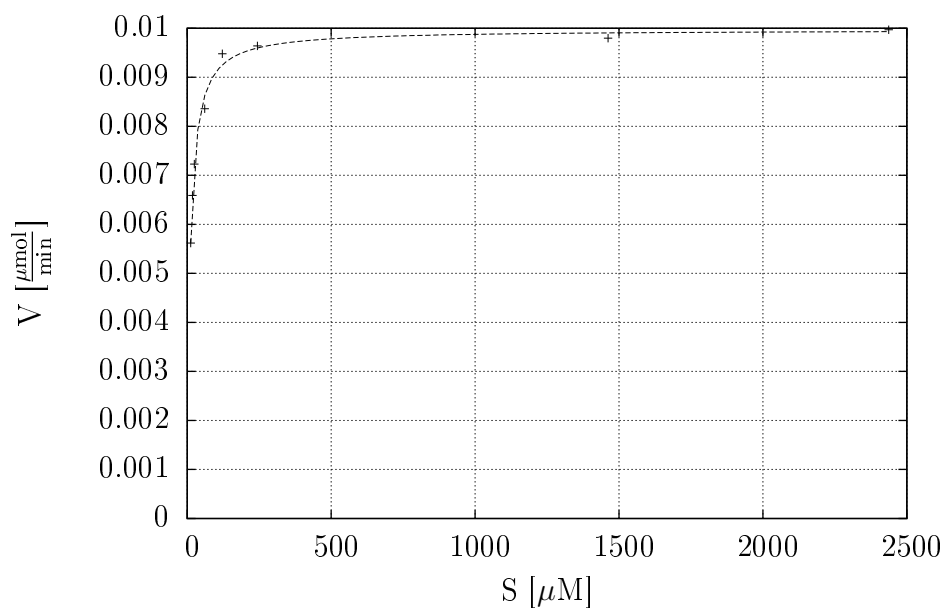
скорости от концентрации субстрата (бисфосфата) в различных координатах, а также линия аппроксимации и значения  $K_M$  и  $V_M$ . В таблице 8 информация  $K_M$  и  $V_M$  собрана воедино.

Таблица 8. Значения  $K_M$  и  $V_M$

Координаты	$K_M, \mu\text{M}$	$V_M, \frac{\mu\text{molS}}{\text{min}}$
Прямые, $V(S)$	9.44	0.00997
Лайнуивера-Берка, $\frac{1}{V}(\frac{1}{S})$	9.38	0.00996
Хэйенса, $\frac{S}{V}(S)$	10.2	0.00997
Еди-Хофсти, $V(\frac{V}{S})$	9.4	0.00996
По литературным данным, для человека [3]	52	

Значения  $K_M$ , полученные в разных координатах, хорошо согласуются между собой и несильно отличаются от литературных значений (отличие меньше, чем на порядок).

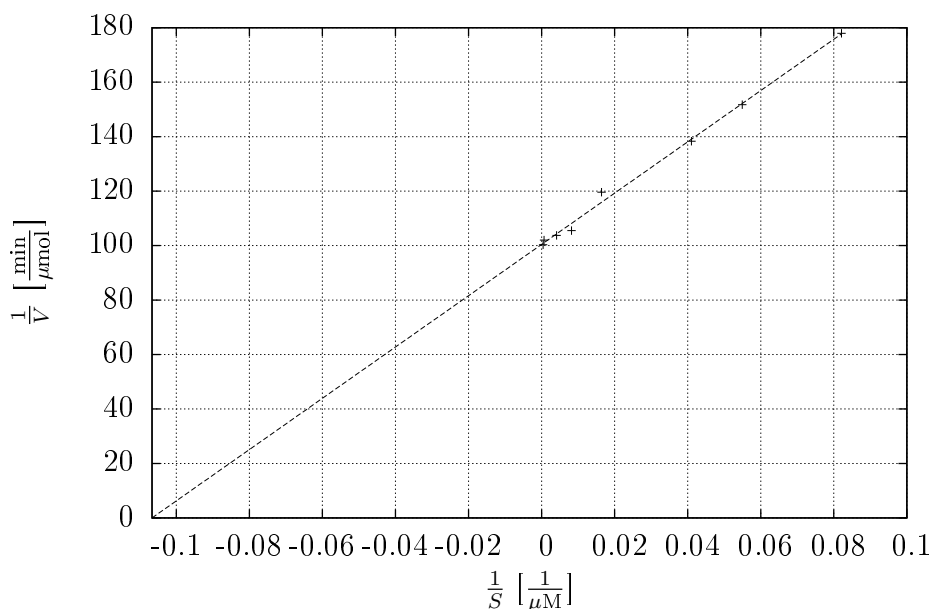
Прямые координаты



$$K_m = 9.44 \mu\text{M}; V_m = 0.00997 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Рис. 12. Кинетический график. Прямые координаты.

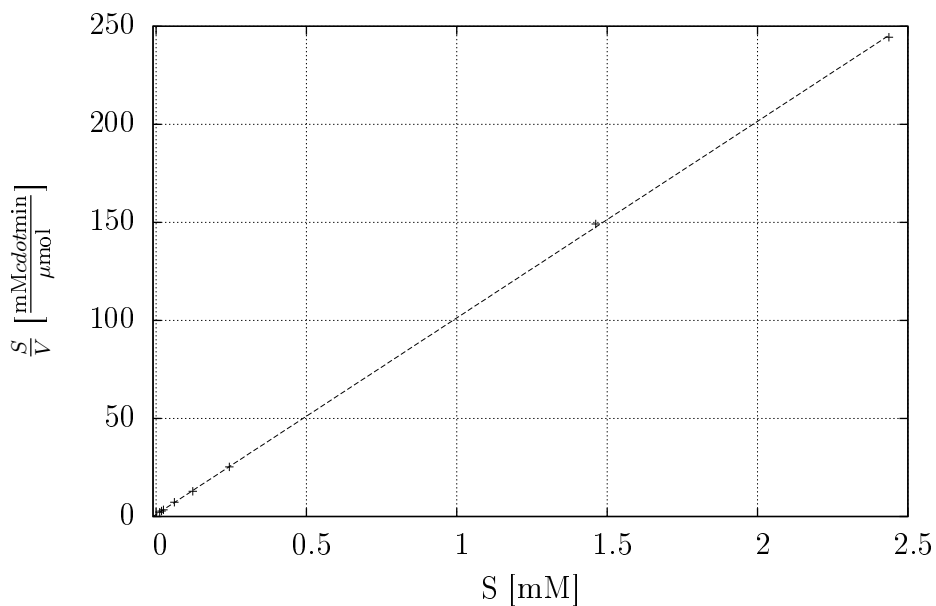
Координаты Лайнуивера-Берка



$$K_m = 9.38 \mu\text{M}; V_m = 0.00996 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Рис. 13. Кинетический график. Координаты Лайнуивера-Берка.

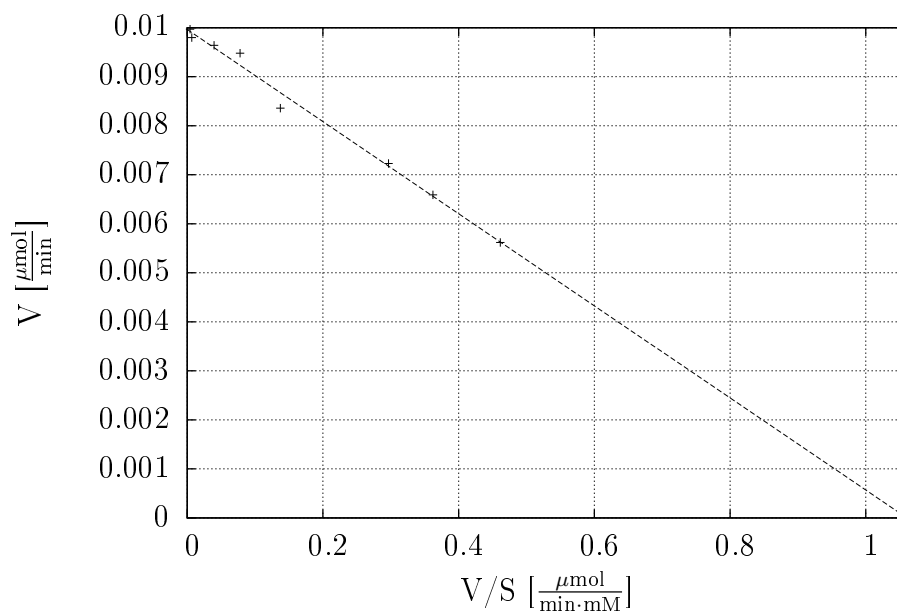
### Координаты Хейнса



$$K_m = 10.2 \mu\text{M}; V_m = 0.00997 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Рис. 14. Кинетический график. Координаты Хэйнса.

### Координаты Еди-Хофсти



$$K_m = 9.4 \mu\text{M}; V_m = 0.00996 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Рис. 15. Кинетический график. Координаты Еди-Хофсти.

## 9 Выводы

В данной работе была проведена очистка и частичная характеристика фермента фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы из мышц кролика (8 ml, 32.7 mg/ml). Студенты ознакомились с методом экстракции, фракционирования, электрофореза и определения кинетических параметров фермента. Для фермента определили молекулярную массу (40.9 kDa), чистоту (65%), активность  $4.2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg}\cdot\text{min}}$  и константу Михаэлиса (около 9.5  $\mu\text{M}$ ).

## Список литературы

- [1] Anderson, P., Gibbons, I., and Perham, R.: A Comparative Study of the Structure of Muscle Fructose 1,6-Diphosphate Aldolases, Eur J Biochem 11, 503, 1969
- [2] Lai, C.Y., Nakai, N. and Chang, D. (1974) Amino acid sequence of rabbit muscle aldolase and the structure of the active center. Science 183: 1204-1206.
- [3] Uniprot, P04075, ALDOA\_HUMAN
- [4] <http://www.worthington-biochem.com/ald/default.html>
- [5] Мкртчян Г. и Меркушина К. Курсовая работа на тему: «Влияние метаболического стресса и беременности на тиаминовый пул в мозге крыс»
- [6] Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Химия Белков
- [7] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- [8] Compton, S.J. and Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal. Biochem. 151(2), 369-374
- [9] Tal, M., Silberstein, A. and Nusser, E. (1980). Why does Coomassie Brilliant Blue® interact differently with different proteins? J. Biol. Chem. 260, 9976-9980