

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

Отчет за практикум по энзимологии

Студентов четвертого курса Мкртчяна Гарика и Нагаева Бориса

2011

Содержание

1	Введение	5
2	Приготовление веществ (1 сентября)	6
2.1	Сульфат аммония, насыщенный раствор, рН 7.5	6
2.2	ЭДТА динатриевая соль, 5 mM раствор, рН 7.5	6
2.3	5% раствор аммиака	6
2.4	раствор сульфата аммония со степенью насыщения 0.52, приготовленный на 5%-ном растворе аммиака	6
2.5	раствор сульфата аммония со степенью насыщения 0.5, приготовленный на 25 mM глицил-глициновом буфере, рН 7.5	7
2.6	Доведение рН концентрированных растворов	7
3	Выделение фермента из скелетных мышц кролика (2 сентября)	7
3.1	Введение в экстракцию	7
3.2	Экстракция	8
3.3	Фракционирование	8
4	Измерение концентраций отобранных проб и продолжение фракционирования (3 сентября)	9
4.1	Фракционирование (продолжение)	9
4.2	Приготовление буфера	9
4.3	Введение в метод Брэдфорд	9
4.4	Калибровка для метода Брэдфорд	10
4.5	Спектрофотометрическое определение концентраций	11
4.6	Определение концентраций белка методом Брэдфорд	11
4.6.1	Проба 2	12
4.6.2	Проба 1	14
4.6.3	Проба 3	14
5	Электрофорез (8 сентября)	15
5.1	Подготовка белков	15
5.2	Суть процесса	15
5.3	Определение концентрации пробы 4	16
5.4	Определение концентрации пробы 2	16
5.5	Исходные концентрации проб	17
5.6	Разбавление белковых проб	17
5.7	Приготовление образцов для электрофореза	17
5.8	Маркеры для электрофореза	17
5.9	Проведение электрофореза	18
5.10	Результаты электрофореза	18
6	Повторение электрофореза (16 сентября)	19
6.1	Маркеры для электрофореза: SM0671	19
6.2	Проведение электрофореза	19
6.3	Результаты электрофореза	20

6.4	Вычисление массы выделенного белка	20
7	Определение активности альдолазы (9 сентября)	21
7.1	Приготовление растворов	21
7.1.1	Глицил-глициновый буфер	21
7.1.2	NADH	21
7.1.3	Соль фруктозобисфосфата	21
7.1.4	Коммерческий препарат ферментов	21
7.1.5	Фруктозобисфосфатаальдолаза	22
7.2	Измерение активности	22
7.3	Пробные опыты	22
7.4	Снятие активности при разных концентрациях альдолазы	23
8	Измерение K_m (10 сентября)	25
9	Измерение K_m (17 сентября)	27
9.1	Вычисление чистоты субстрата	27
9.2	Повторное измерение K_m	28
9.2.1	Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата	28
9.3	Результаты	31
9.4	Обсуждение	31
10	Выводы	32

Список обозначений

Da Дальтон

M моль/литр

mg миллиграмм

ml миллилитр

μ g микрограмм

μ l микролитр

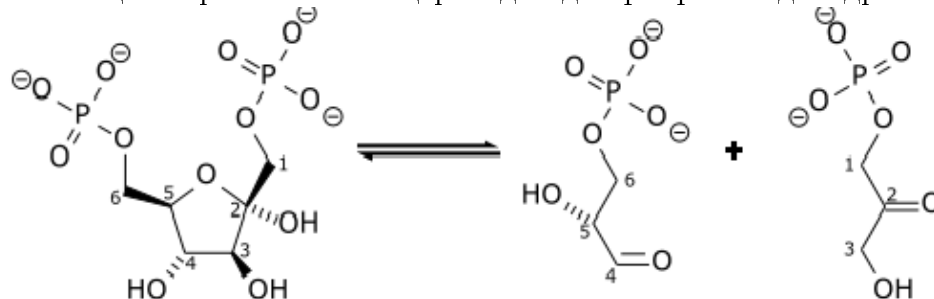
альдолаза фруктозодифосфатаальдолаза

бисфосфат фруктозо-1,6-дифосфат

1 Введение

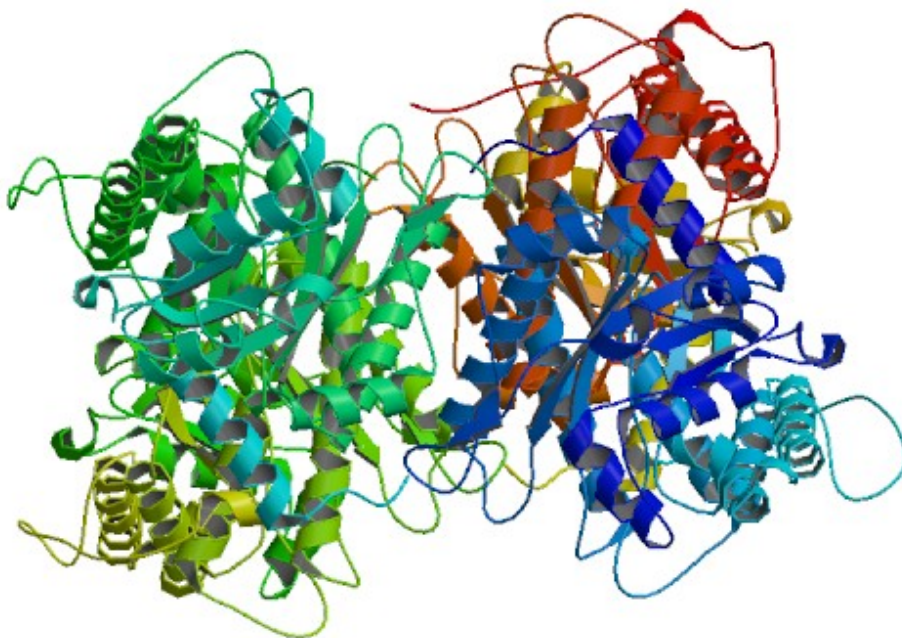
Фермент фруктозо-1,6-дифосфата альдозаза (ЕС 4.1.2.13) катализирует обратимое расщепление фруктозо-1,6-дифосфата между C_3 и C_4 с образованием диоксиацетонфосфата и глицеральдегидфосфата. Равновесие сильно смещено в направлении обратной реакции. Данная реакция является частью гликолиза. Также фермент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

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 альдозазы, характерные для мышцы, печени и мозга (А, В, С).

Пространственная структура альдозазы 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]. Альдозазы 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 (1 сентября)

Были приготовлены и убраны в холодильник следующие вещества:

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

2.1 Сульфат аммония, насыщенный раствор, pH 7.5

Данное вещество было выдано нам преподавателем.

2.2 ЭДТА динатриевая соль, 5 mM раствор, pH 7.5

$$M = 372.24 \text{ Da}$$

$$c = 5 \text{ mM}$$

$$V = 250 \text{ ml}$$

$$m = McV = 0.4653 \text{ g}$$

2.3 5% раствор аммиака

Готовят из концентрированного аммиака, 25%. Было использовано 60 ml 25%-ного аммиака, который развели до 300 ml бидистиллированной водой.

2.4 раствор сульфата аммония со степенью насыщения 0.52, приготовленный на 5%-ном растворе аммиака

$$X = \frac{0.515V(C_2 - C_1)}{1 - 0.272 \cdot C_2}$$

$$C_2 = 0.52$$

$$C_1 = 0$$

$$V = 250 \text{ ml}$$

Масса сухого сульфата аммония: 77.9794 g.

2.5 раствор сульфата аммония со степенью насыщения 0.5, приготовленный на 25 mM глицил-глициновом буфере, рН 7.5

$$V = 100\text{ml}$$

1. сульфат аммония

$$X = \frac{0.515V(C_2 - C_1)}{1 - 0.272 \cdot C_2} = 29.8032\text{g}$$

2. глицил-глициновом

$$m = M \cdot c \cdot V = 132.12\text{Da} \cdot 0.025\text{M} \cdot 0.1\text{l} = 0.3303\text{g}$$

2.6 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. получить примерное значение рН, используя индикатор
2. отобрать небольшую пробу, например, 2 ml
3. разбавить в 20 раз
4. погрузить электрод
5. довести рН до требуемого, прикапывая кислоту или щелочь
6. чтобы довести рН исходного раствора, следует добавить $\frac{2}{3} \frac{V}{2\text{ml}} V_a$ кислоты или щелочи, где: V – объем исходного раствора, V_a – объем добавленной кислоты или щелочи

3 Выделение фермента из скелетных мышц кролика (2 сентября)

Работу проводили в посуде, помещенной в лед.

3.1 Введение в экстракцию

Исследование уникального метаболомного профиля системы, т.е его метабололического 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 г 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 пропустили 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 раствора был доведен до 7.5. Для этого прикапывали равный объем (240 ml) холодного 5%-ный аммиака с помощью делительной воронки, при интенсивном перемешивании в течении 30 минут. Степень насыщения стала равной 0.5. После этого оставили на 15 минут на холоде.

Затем раствор отцентрифугировали (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 рН концентрированных растворов (см. 2.6).

Раствор оставили на сутки в холодильнике, ожидая появления кристаллов.

4 Измерение концентраций отобранных проб и продолжение фракционирования (3 сентября)

4.1 Фракционирование (продолжение)

Раствор, полученный накануне (см. 3.3), был оставлен на сутки в холодильнике. Однако кристаллы альдолазы так и не выпали. Чтобы получить кристаллы, раствор довели до комнатной температуры, после чего поставили в холодильник. Раствор помутнел.

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

4.2 Приготовление буфера

Для определения концентраций по методу Брэдфорд требуется буфер. В качестве буфера использовался 50 mM раствор калий-фосфатного буфера (K_2HPO_4).

$$M = 136.09 \text{ Da}$$

$$c = 50 \text{ mM}$$

$$V = 100 \text{ ml}$$

$$m = McV = 0.68045 \text{ g}$$

4.3 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].

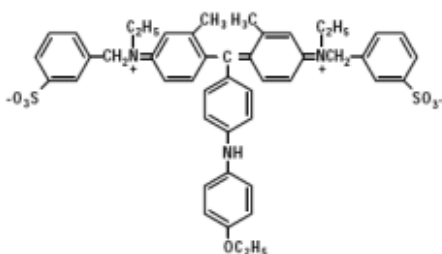


Рис. 1: Краситель Coomassie Brilliant Blue G-250

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.

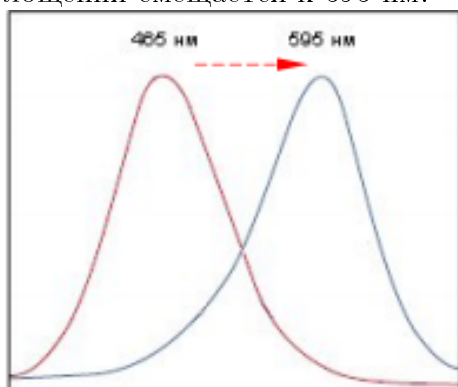


Рис. 2: Сдвиг максимума поглощения после связывания Coomassie с белком

4.4 Калибровка для метода Брэдфорд

μg белка на кювету	A
8	0.0879
8	0.0891
8	0.0897
16	0.1197
16	0.1158
16	0.1196
24	0.1570
24	0.1567
24	0.1594
32	0.1883
32	0.1928
32	0.1954
40	0.199
40	0.2
40	0.201

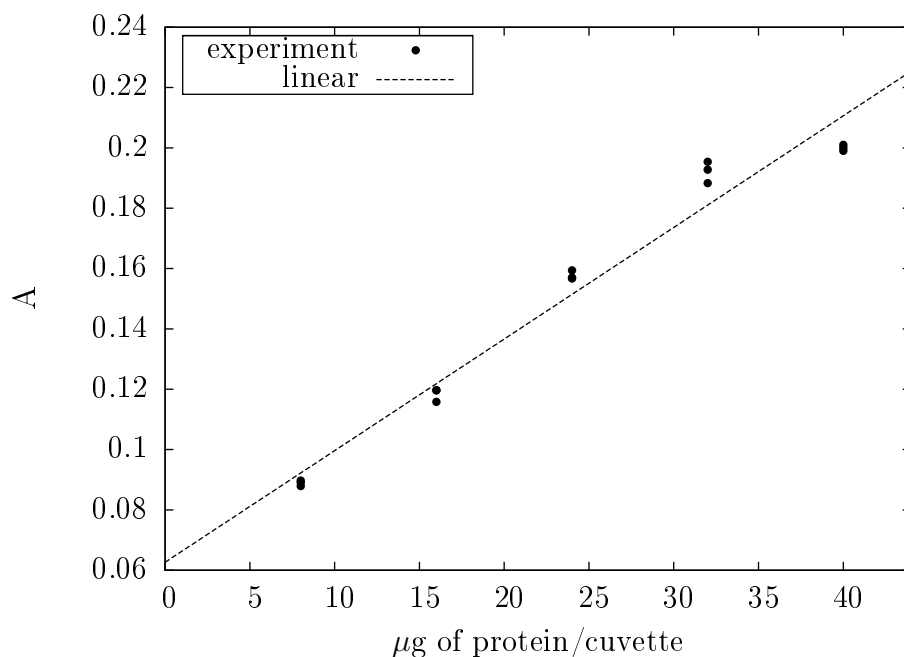
Под экспериментальные данные была подогнана линейная зависимость:

$$A = A_0 + k \cdot m$$

Оценка значений A_0 и k :

$$A_0 = 0.0626267 \pm 0.005155(8.231\%)$$

$$k = 0.0037 \pm 0.0001943(5.251\%)$$



4.5 Спектрофотометрическое определение концентраций

Для всех тех проб действовали по следующей схеме:

1. набирали 2 ml бидистиллированной воды в кювету
2. обнуляли прибор
3. доливали 50 μl раствора из пробы
4. снимали значение A_{280}

Таким образом, разведение равно 41. Было допущено, что удельное поглощение $\epsilon = 1$ для белка. Толщина кюветы $l = 1\text{cm}$. Таким образом, концентрация белка в пробе равна [mg/ml]:

$$c = 41 \cdot A$$

Проба	A	C[mg/ml]
1	0.2	8.2
1	0.49	20
1	0.54	22
2	0.0707	2.9
2	0.177	7.257
2	0.2	8.2
3	0.154	6

4.6 Определение концентраций белка методом Брэдфорд

Учитывая примерные концентрации, полученные спектрофотометрическим методом, раствор из проб развели так, чтобы концентрация лежала в пределах калибровочной кривой.

Количество μg белка в кювете может быть получено по следующей формуле:

$$m = \frac{A - A_0}{k}$$

Оценки значений значения A_0 и k : см. 4.4

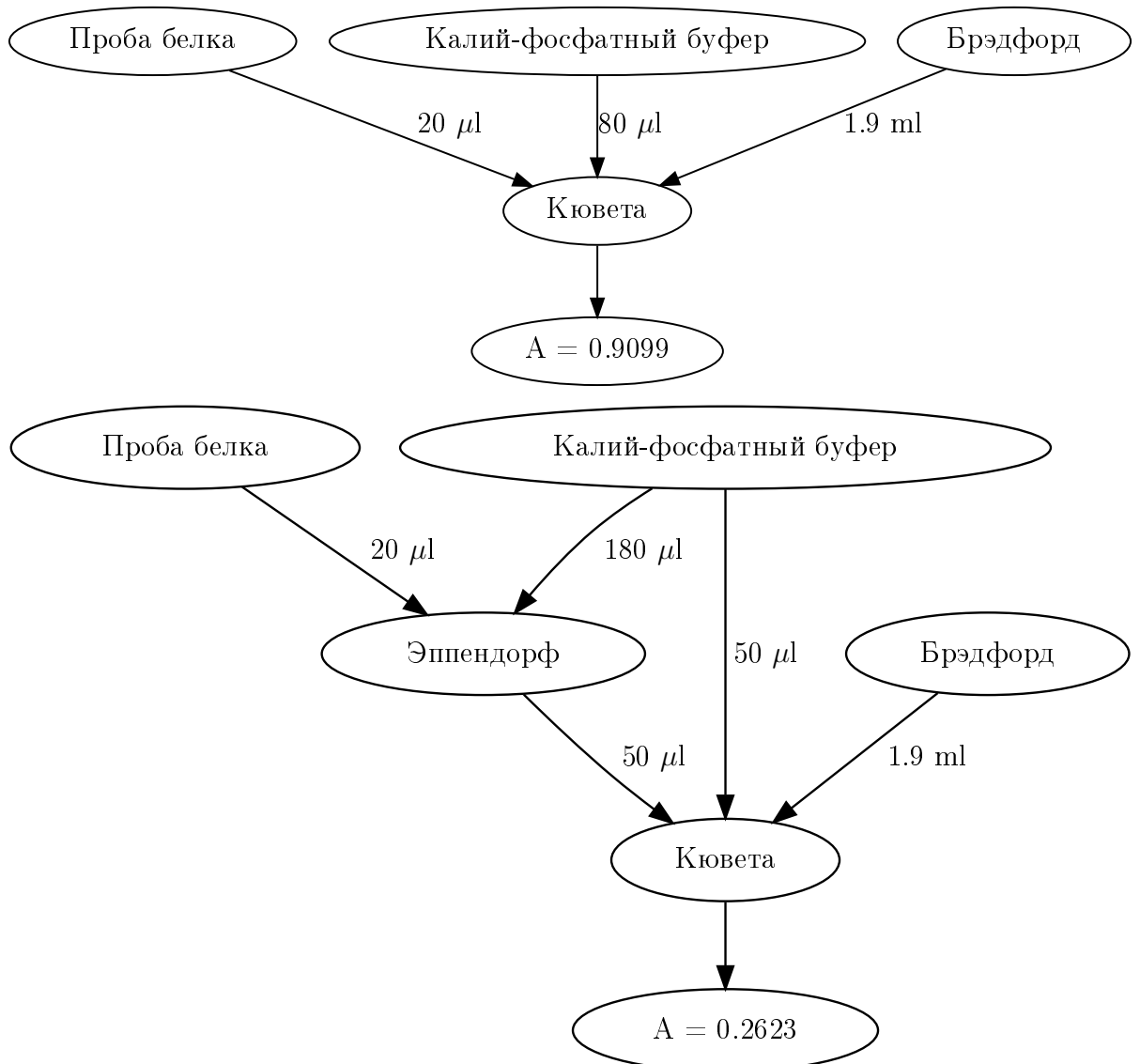
Концентрация белка в пробе (mg/ml):

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

где m – содержание белка в кювете (μg), N – разведение, V_c – объем кюветы (2 ml).

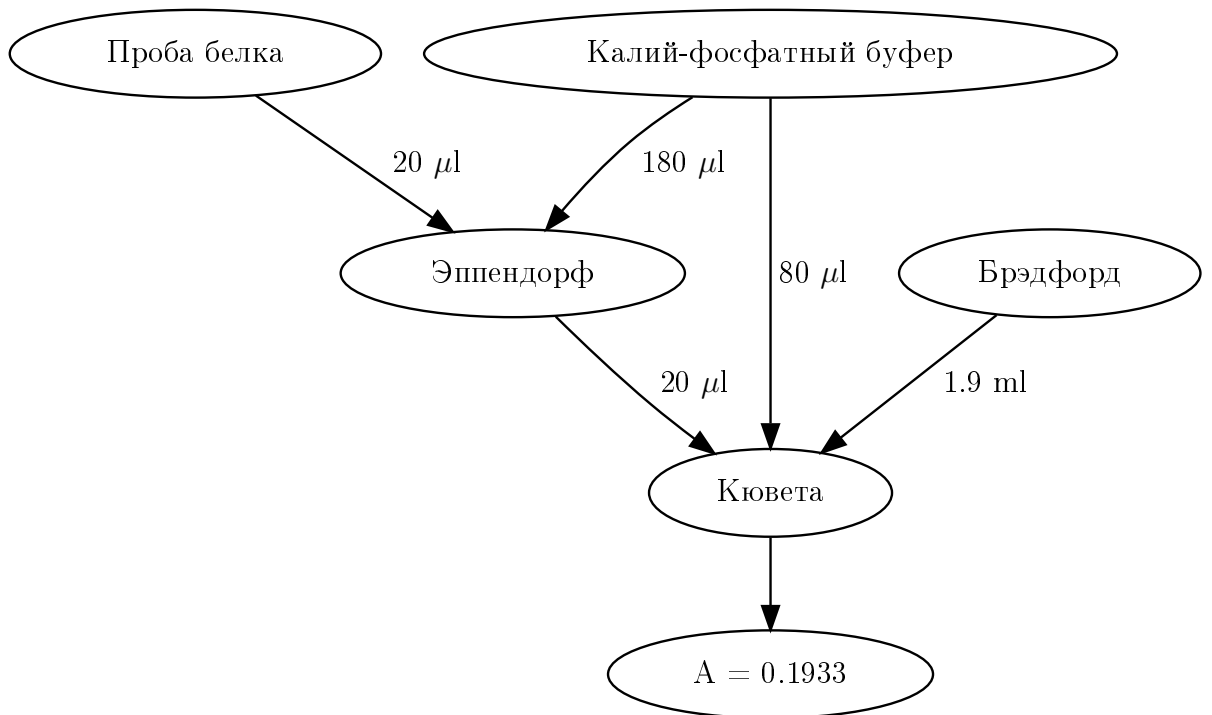
4.6.1 Проба 2

Начали анализ с *пробы 2*, в связи с чем потребовалось 4 попытки, чтобы попасть в область калибровочной кривой.



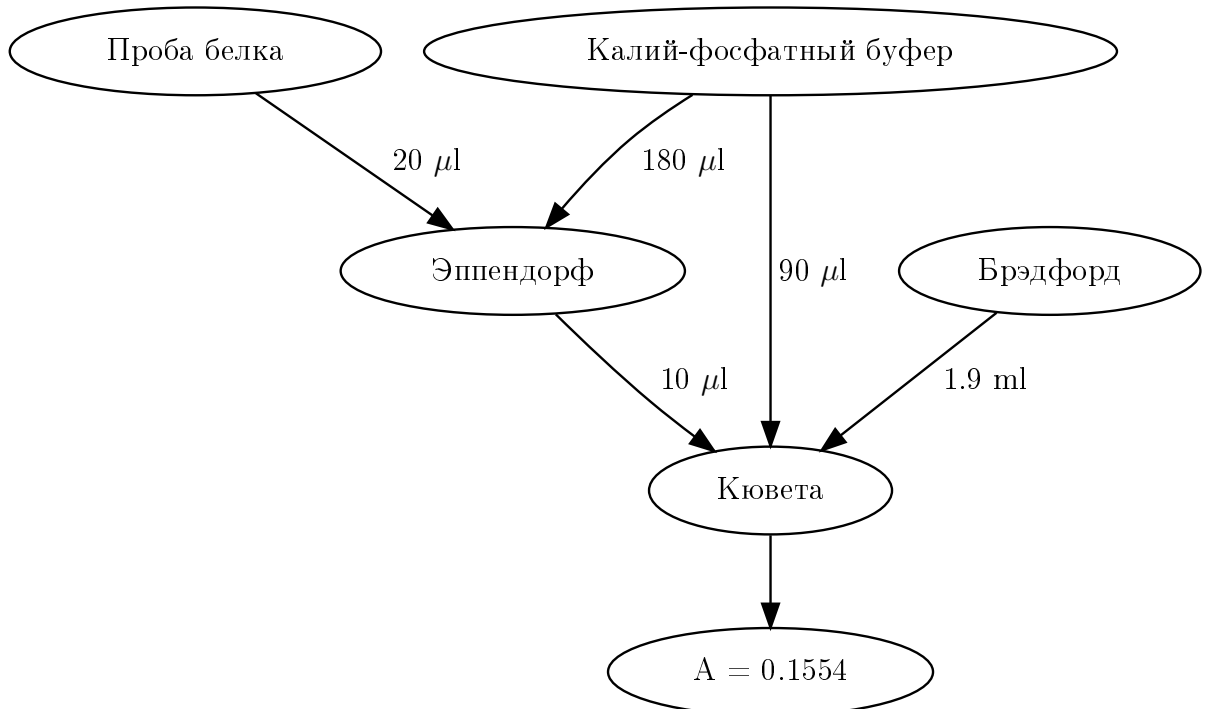
Содержание белка: $m = \frac{A - A_0}{k} = 53.97 \mu\text{g}$ белка на кювету.

Разведение: $N = 400$ раз. Концентрация белка в пробе: $c = \frac{m \cdot N}{V_c} = 10.8 \text{ mg/ml}$.



Содержание белка: $m = \frac{A-A_0}{k} = 35.32 \mu\text{g}$ белка на кювету.

Разведение: $N = 1000$ раз. Концентрация белка в пробе: $c = \frac{m \cdot N}{V_c} = 17.6 \text{ mg/ml}$.

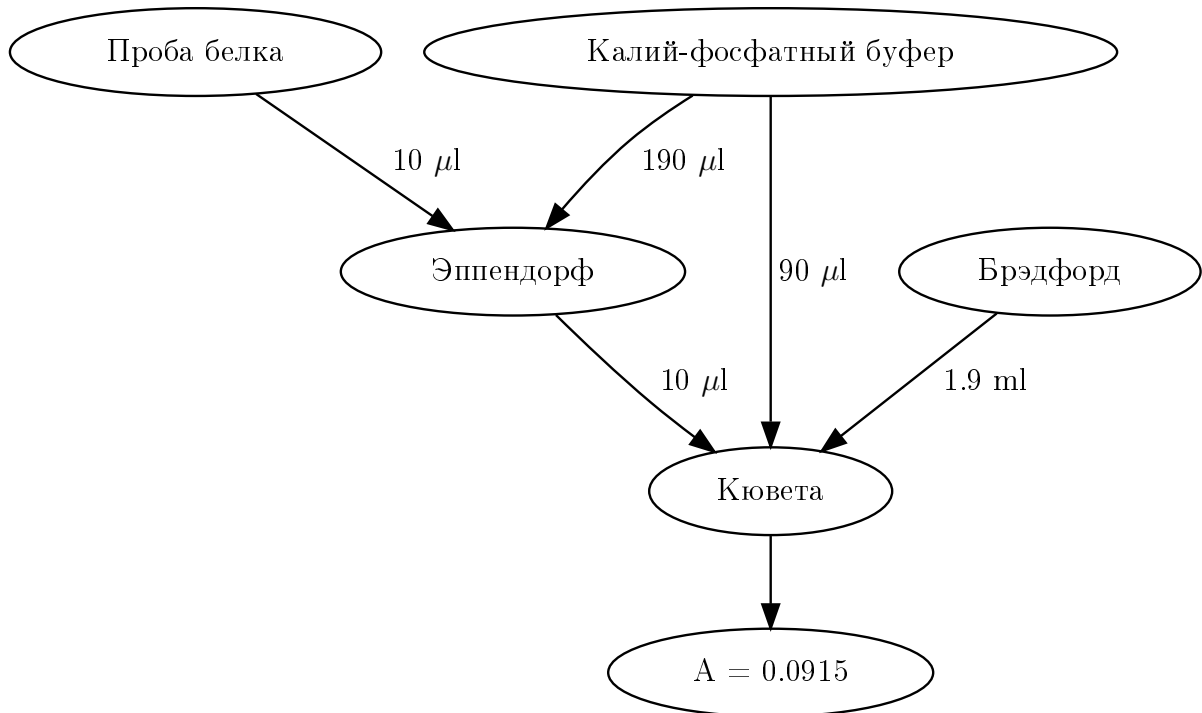


Содержание белка: $m = \frac{A-A_0}{k} = 25.07 \mu\text{g}$ белка на кювету.

Разведение: $N = 2000$ раз. Концентрация белка в пробе: $c = \frac{m \cdot N}{V_c} = 25.1 \text{ mg/ml}$.

Последние два опыта привели к желаемому результату (A находится в области калибровочной прямой).

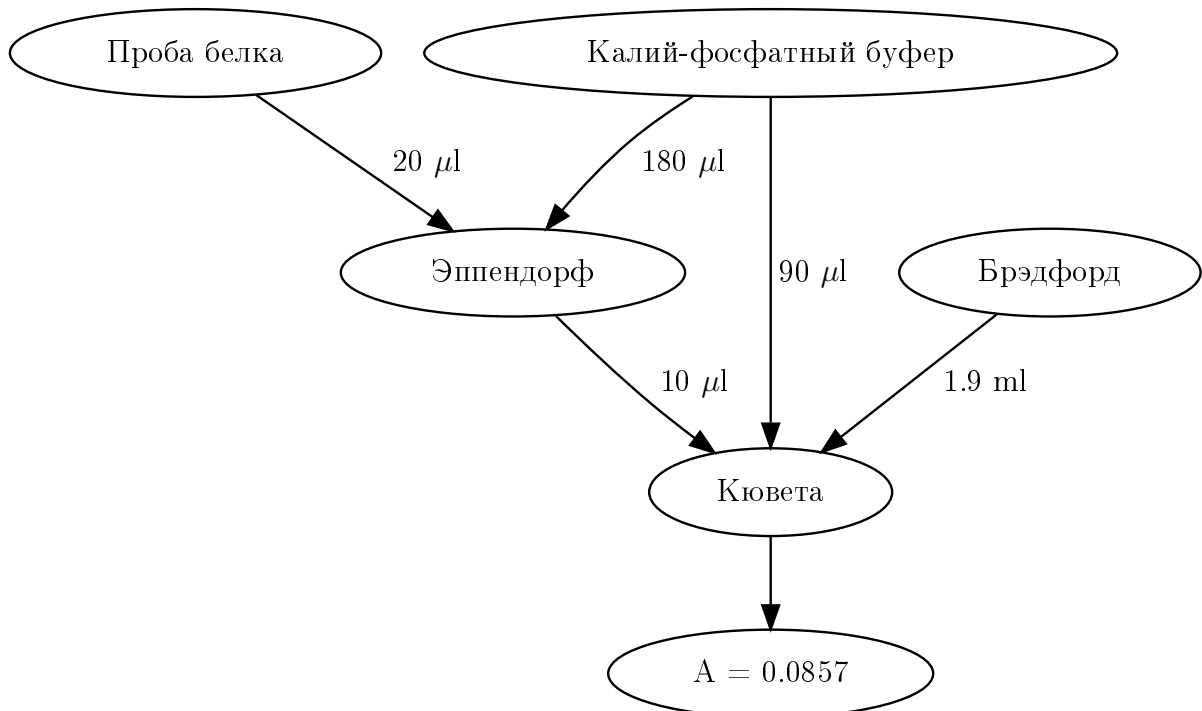
4.6.2 Проба 1



Содержание белка: $m = \frac{A-A_0}{k} = 7.8 \mu\text{g}$ белка на кювету.

Разведение: $N = 4000$ раз. Концентрация белка в пробе: $c = \frac{m \cdot N}{V_c} = 15.6 \text{ mg/ml}$.

4.6.3 Проба 3



Содержание белка: $m = \frac{A-A_0}{k} = 6.2 \mu\text{g}$ белка на кювету.

Разведение: $N = 2000$ раз. Концентрация белка в пробе: $c = \frac{m \cdot N}{V_c} = 6.2 \text{ mg/ml}$.

5 Электрофорез (8 сентября)

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 β -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. β -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.

5.2 Суть процесса

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 рН) большинство молекул глицина изменят 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.

5.3 Определение концентрации пробы 4

Предполагалось, что в пробе 4 содержится суспензия альдолазы. Чтобы исследовать пробу 4 методом электрофореза, требуется знать примерную концентрацию белка в пробе. Для этого провели ещё одно спектрофотометрическое определение концентрации.

Было отобрано $10 \mu\text{l}$ пробы и помещено в кювету объемом 2 ml . Разведение составило 201 раз.

$$A_{260} = 0.110$$

$$A_{280} = 0.148$$

По формуле Калькара

$$c = N(1.45A_{280} - 0.74A_{260}) = 201(1.45 \cdot 0.148 - 0.74 \cdot 0.110) = 26.8 \text{ mg/ml}$$

Учитывая, что проба 4 считается очищенной от нуклеотидов и остальных белков, можно применить следующую формулу:

$$c = N \frac{A_{280}}{\epsilon l} = 201 \frac{0.148}{0.91 \cdot 1} = 32.7 \text{ mg/ml}$$

Таким образом, концентрацию альдолазы в пробе 4 будем считать 32.7 mg/ml .

5.4 Определение концентрации пробы 2

Так как значения концентрации пробы 2 получились довольно разными, было проведено повторное определение концентрации пробы 2 спектрофотометрическим методом.

Было отобрано $80 \mu\text{l}$ пробы и помещено в кювету объемом 2 ml . Разведение составило 26 раз.

$$A_{260} = 0.526$$

$$A_{280} = 0.343$$

По формуле Калькара

$$c = N(1.45A_{280} - 0.74A_{260}) = 26(1.45 \cdot 0.343 - 0.74 \cdot 0.526) = 2.8 \text{ mg/ml}$$

5.5 Исходные концентрации проб

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, что концентрация пробы 2 равна 10.8 mg/ml.

5.6 Разбавление белковых проб

Известно, что для использования пробы в электрофорезе концентрация белка должна быть примерно 0.5 mg/ml. Объем образца для электрофореза: 200 μ 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 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.

Рассчитаем объемы, которые нужно отбирать из разбавленных в 5 раз проб:

Проба	C_1 [mg/ml]	V [μ l]
1	15.6	32.05
2	10.8	46.3
3	6.2	80.65
4	32.7	18.7

5.7 Приготовление образцов для электрофореза

4-х кратный буфер для образцов (SB) был выдан преподавателем. Для получения однократного буфера, 4-х кратный буфер был разбавлен в 4 раза. В 1 мл SB было добавлено 50 μ 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 μ l SB.

Проба	H_{20}	Проба/5	SB
1	118	32	50
2	104	46	50
3	70	80	50
4	131	18.7	50

5.8 Маркеры для электрофореза

1. Phosphorilase B, 97 kDa

2. BSA, 66.2 kDa
3. Ovalbumin, 45 kDa
4. Carbonic anhydrase, 31 kDa
5. Trypsin inhibitor, 21.5 kDa
6. Lysozyme, 14.4 kDa

Оптimum нанесения: 3–5 μl на дорожку. Хранение при -20°C .

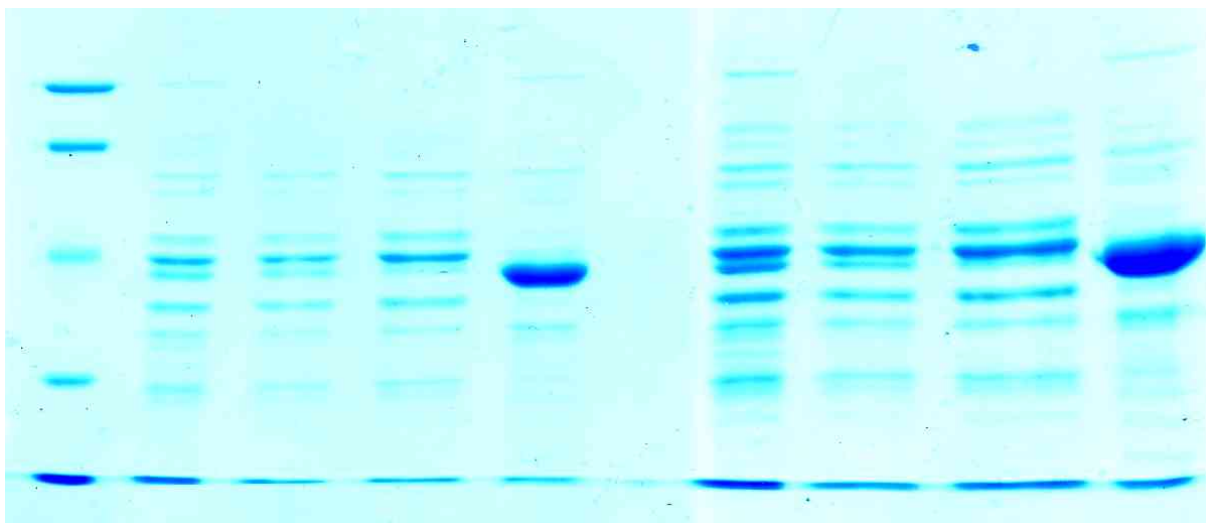
5.9 Проведение электрофореза

В 10 лунок геля были нанесены образцы:

1. маркер
2. проба 1 (8 μl , 4 μg)
3. проба 2 (8 μl , 4 μg)
4. проба 3 (8 μl , 4 μg)
5. проба 4 (8 μl , 4 μg)
6. пустая
7. проба 1 (16 μl , 8 μg)
8. проба 2 (16 μl , 8 μg)
9. проба 3 (16 μl , 8 μg)
10. проба 4 (16 μl , 8 μg)

Параметры электрофореза: 20 mA, 400 V.

5.10 Результаты электрофореза



Вывод: последняя стадия эффективно отделила альдолазу.

К сожалению, белки-маркеры оказались подпорченными, в связи с чем оценить массу выделенного белка не удалось.

6 Повторение электрофореза (16 сентября)

Весь электрофорез был повторен с новыми белками-маркерами (5.9).

6.1 Маркеры для электрофореза: SM0671

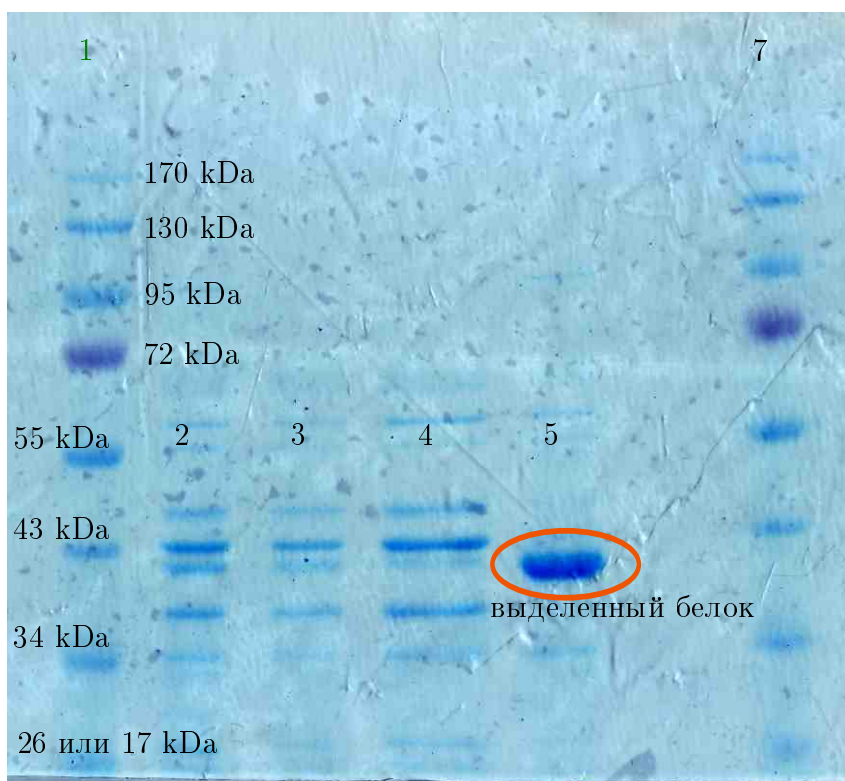
1. 170 kDa
2. 130 kDa
3. 95 kDa
4. 72 kDa – красный
5. 55 kDa
6. 43 kDa
7. 34 kDa
8. 26 kDa
9. 17 kDa
10. 10 kDa – желтый

6.2 Проведение электрофореза

В 10 лунок геля были нанесены образцы:

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

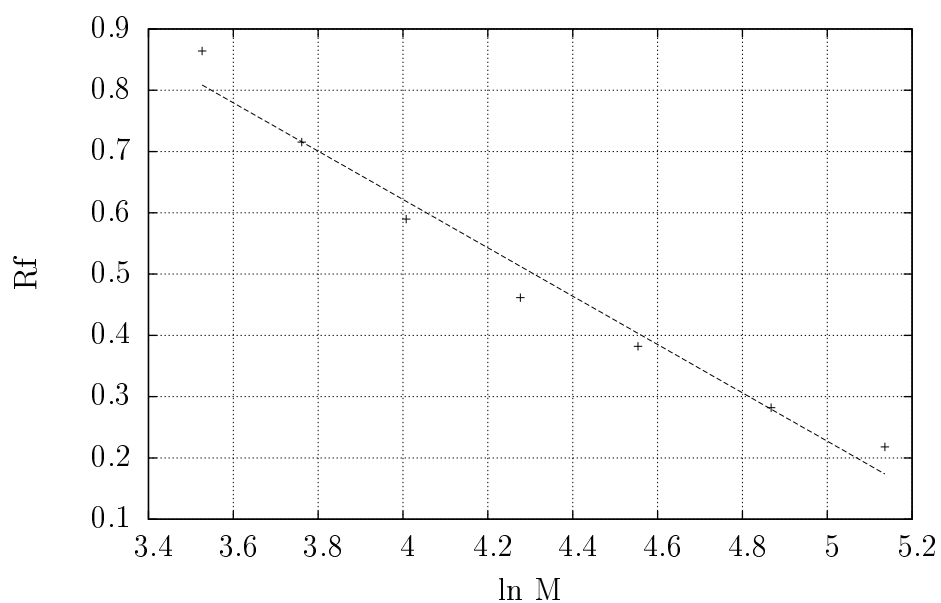
6.3 Результаты электрофореза



6.4 Вычисление массы выделенного белка

Выделенный белок немного легче маркера 6, имеющего массу 43 kDa. Это согласуется с литературными данными (см. 1).

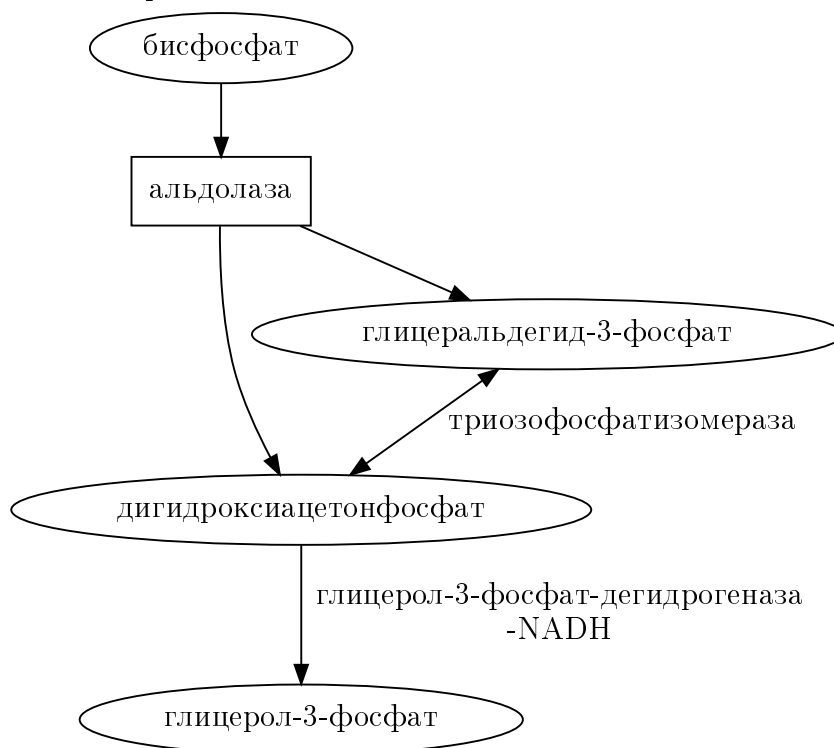
Электрофоретическое определение молекулярной массы белков



$$M = 40.9 \text{ Da}$$

7 Определение активности альдолазы (9 сентября)

Решили измерять активность по NADH.



7.1 Приготовление растворов

7.1.1 Глицил-глициновый буфер

$$m = M \cdot c \cdot V = 132.12 \text{Da} \cdot 0.05 \text{M} \cdot 0.1 \text{l} = 0.6606 \text{g}$$

pH раствора был доведен до 7.5.

7.1.2 NADH

$$m = M \cdot c \cdot V = 763 \text{Da} \cdot 0.02 \text{M} \cdot 0.001 \text{l} = 0.01526 \text{g}$$

7.1.3 Соль фруктозобисфосфата

$$m = M \cdot c \cdot V = 378 \text{Da} \cdot 0.075 \text{M} \cdot 0.001 \text{l} = 0.02837 \text{g}$$

7.1.4 Коммерческий препарат ферментов

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.

7.1.5 Фруктозобисфосфатальдолаза

Раствор был приготовлен на 50 mM глицил-глициновом буфере.

7.2 Измерение активности

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 μ l вспомогательных ферментов
3. альдолаза
4. поместить кювету в прибор и обулить
5. добавить 15 μ l NADH
6. добавить бисфосфат на палочке и перемешать этой же палочкой
7. запустить прибор

При измерения активности изменяли объем вносимой альдолазы, при измерении K_M – объем бисфосфата (субстрата альдолазы). При измерения активности объем добавляемого бисфосфата оставался постоянным (60 μ l).

7.3 Пробные опыты

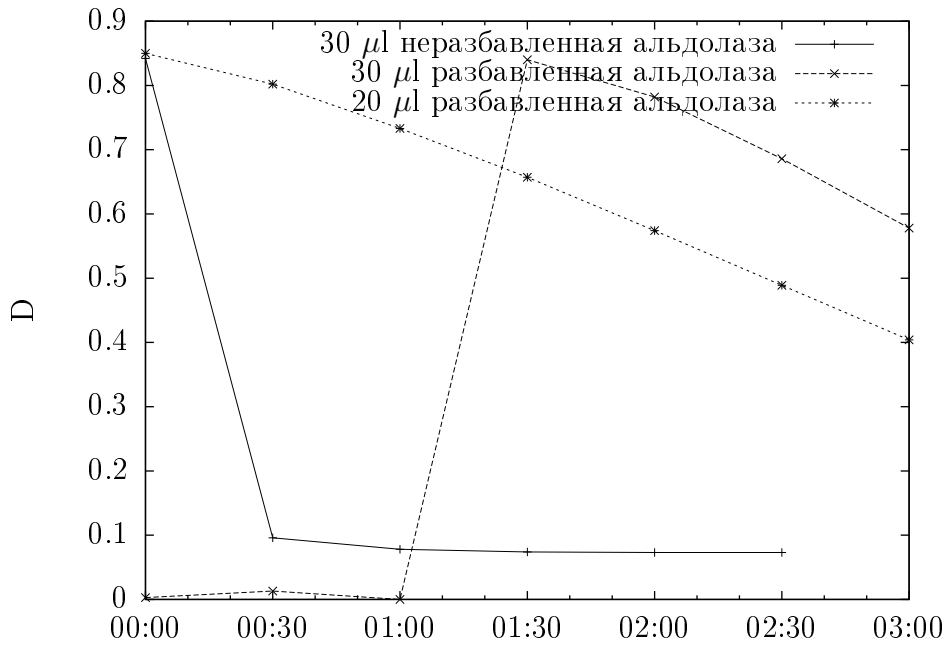
NADH вносят так, чтобы значение A после добавления NADH было около 0.8

В первую попытку внесли 2 ml буфера и 30 μ l NADH. Значение A составило 1.484. Это значение слишком велико.

В второй раз (и в последующие разы) вносили по 15 μ l NADH и 30 μ l альдолазы из пробы 4. Однако такое количество альдолазы слишком быстро израсходовало весь субстрат.

Альдолазу из пробы 4 разбавили в 100 раз (10 μ l альдолазы в 1 ml воды). В третий раз отобрали 30 μ l разбавленной альдолазы. Отсчет времени запустили после добавления NADH. Получилась довольно странная зависимость (D было низким до добавления субстрата, а затем выросло). По-видимому, это вызвано тем, что отсчет времени был включен до перемешивания.

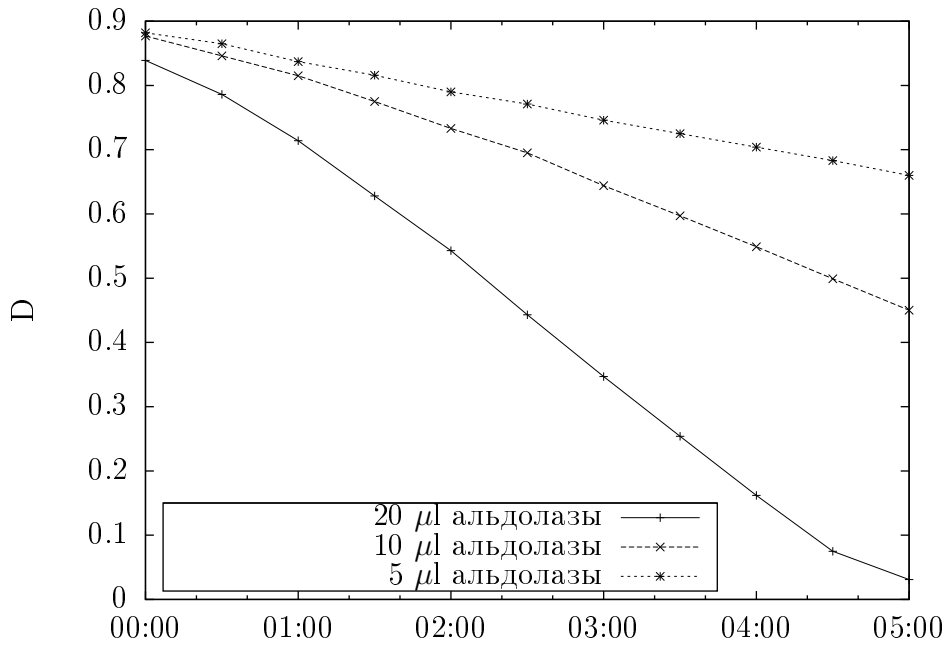
В четвертый раз внесли 20 μ l альдолазы (начиная с этого опыта, вносили разбавленную альдолазу). Получилась хорошая зависимость. Однако решили снимать показания в течении 5 минут.



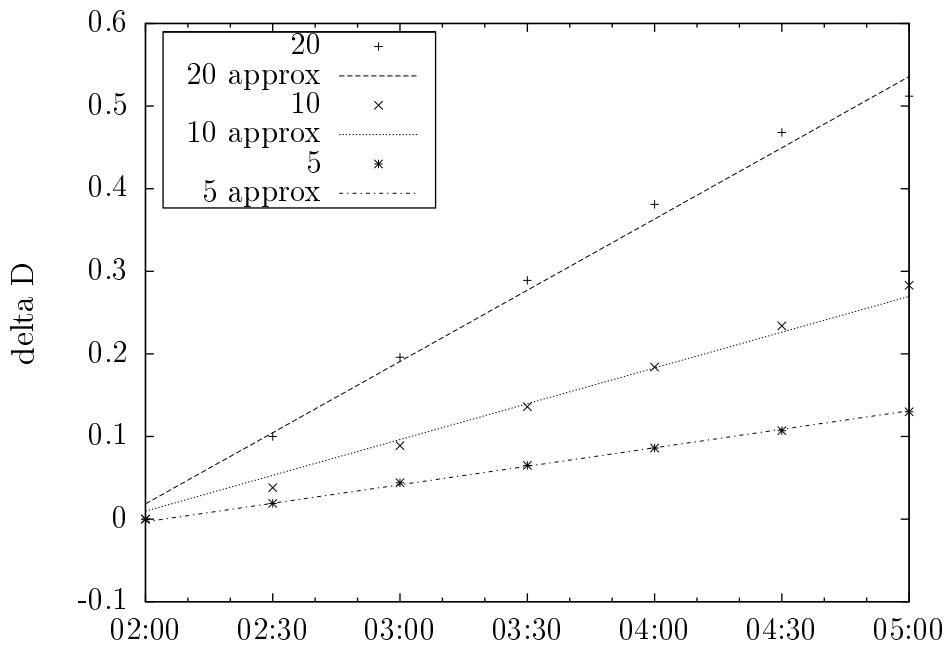
7.4 Снятие активности при разных концентрациях альдолазы

Была проведена серия экспериментов (см. 7.2). При этом концентрация субстрата оставалась неизменной ($60 \mu\text{l}$). 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 mM . Значит, концентрация бисфосфата в кювете около $\frac{75}{33} = 2.3 \text{ mM}$, что намного превышает K_M . Так как насыщающей концентрацией можно считать концентрацию $10\text{--}20 K_M$, 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. Были получены следующие зависимости:



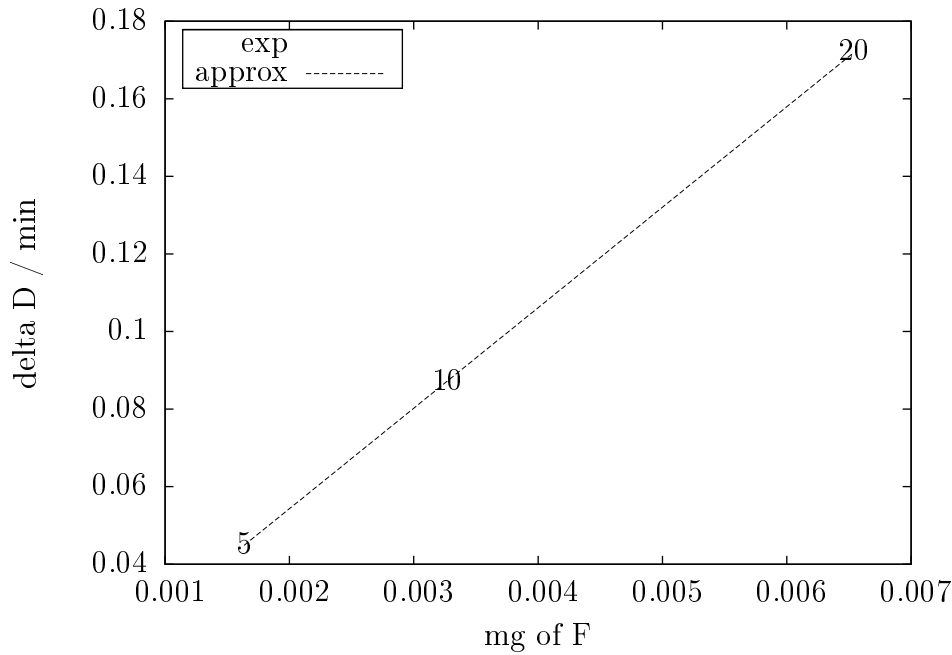
Зависимости пересчитали на ΔD , которое пропорционально количеству израсходованного субстрата. ΔD рассчитывали, как разность исходного и текущего значений D . Кроме того, рассматривали зависимость, спустя 2 минуты от начала отсчета, так как до 2 минут реакция, кажется, находится в лаг-фазе.



Зависимости спрямили. Значения $\frac{\Delta D}{\min}$:

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

По данным точкам построили график:



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

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

По оси абсцисс отложено содержание (в mg) альдолазы в кювете. Объемы добавляемой альдолазы (20, 10 и 5 μl) отмечены внутри графика.

После спрямления зависимости выяснилось, что $\frac{\Delta D}{\text{min} \cdot \text{mg}} = 25.9$.

Вычислим активность альдолазы:

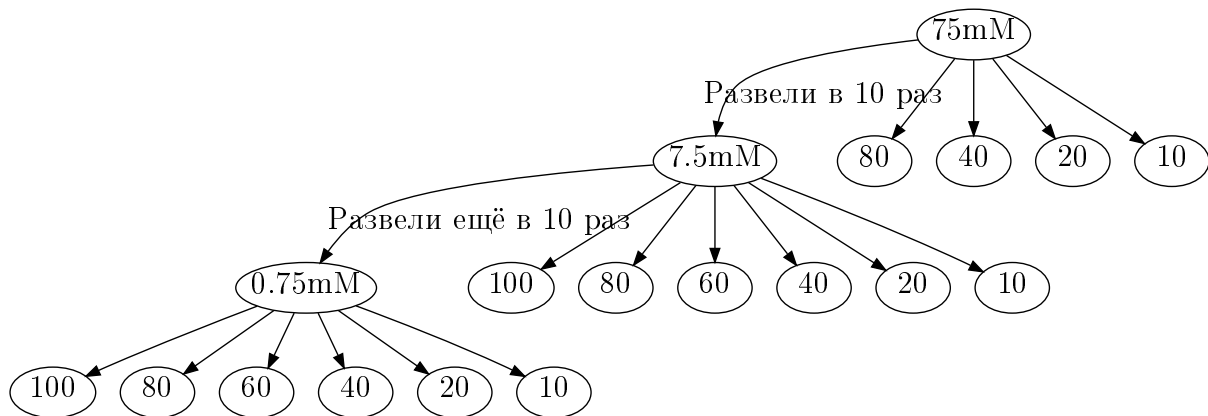
$$E = \frac{1}{2 \text{ мин} \cdot 6.22 \cdot \text{mg альдолазы}} \Delta D_{340} \cdot V = \frac{1}{2} 25.9 \cdot \frac{2 \text{ ml}}{6.22} = 4.2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{мин}}$$

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

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

8 Измерение K_m (10 сентября)

Была проведена серия экспериментов, описанных в 7.2. При этом количество альдолазы оставалось постоянным (10 μl , разбавленная в 100 раз), а количество бисфосфата изменялось.

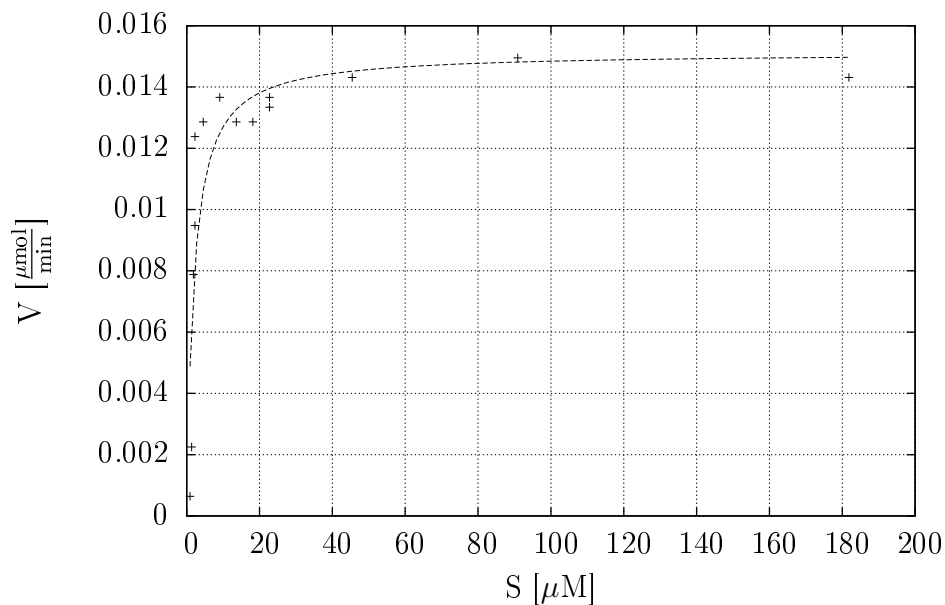


Пример данных, снимаемых с прибора:

Время	100	80	60	40	20	10
0:00	0.796	0.837	0.865	0.849	0.858	0.882
0:30	0.773	0.814	0.847	0.829	0.837	0.868
1:00	0.741	0.783	0.822	0.799	0.817	0.860
1:30	0.704	0.748	0.792	0.770	0.806	0.856
2:00	0.665	0.713	0.761	0.747	0.805	0.855
2:30	0.626	0.676	0.732	0.735	0.799	0.855
3:00	0.587	0.645	0.706	0.728	0.798	0.856
3:30	0.550	0.625	0.687	0.726	0.799	0.857

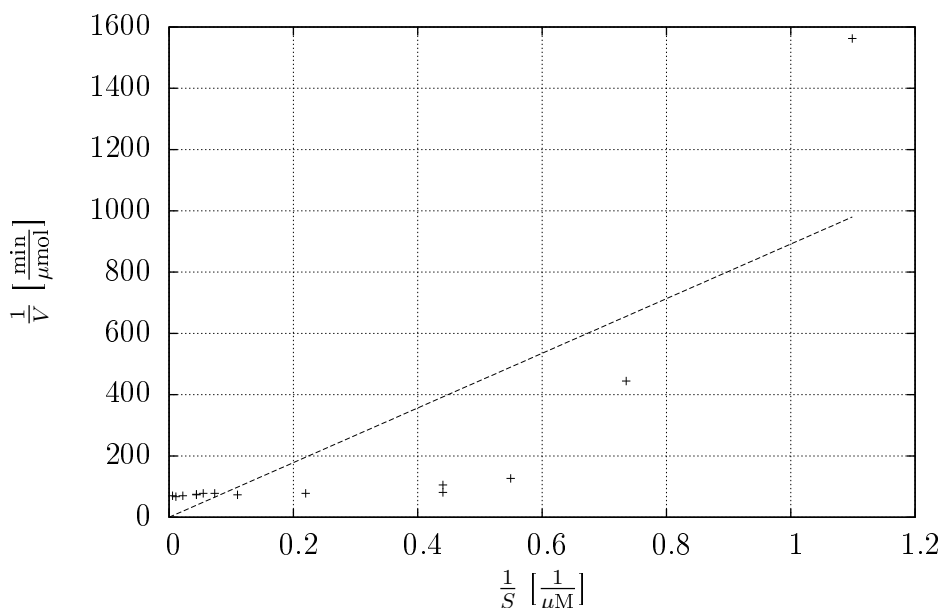
Пример полученных графиков:

Прямые координаты



$$K_m = 1.91 \mu\text{M}; V_m = 0.0151 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Координаты Лайнуивера-Берка



$$K_m = 3.84e+05 \mu\text{M}; V_m = 431 \mu\text{mol}/\text{min}$$

К сожалению, полученные данные оказались слишком зашумленными, только 3 точки пришлось на «спуск» графика Михаэлиса-Ментен. Поэтому измерение K_m было переделано.

9 Измерение K_m (17 сентября)

9.1 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.

$$\begin{aligned} \Delta D &= 0.305 \\ \Delta \nu \text{NADH} &= \frac{\Delta D \cdot V_{\text{КЮВЕТЫ}}}{6.22} = 0.098 \mu\text{mol} \\ \nu S &= \frac{1}{2} \Delta \nu \text{NADH} = 0.049 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} C_{S \text{ в КЮВЕТЕ}} &= \frac{\nu S}{V_{\text{КЮВЕТЫ}}} = \frac{0.049}{2} = 0.0245 \text{mM} \\ C_S &= C_{S \text{ в КЮВЕТЕ}} \cdot N = 0.0245 \text{M} \cdot 200 \cdot 10 = 49 \text{mM} \\ \text{чистота} &= \frac{49 \text{mM}}{75 \text{mM}} = 0.65 (65\%) \end{aligned}$$

9.2 Повторное измерение Km

Действовали по прежней схеме (см. 8), но:

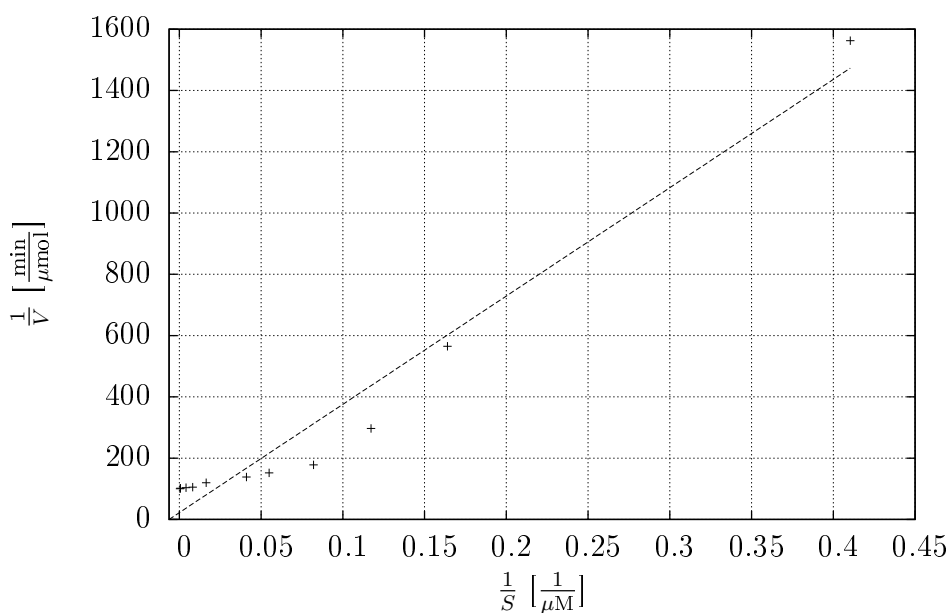
1. сначала провели измерения при самых больших и самых низких концентрациях субстрата, после чего придерживались бинарного поиска. По-видимому, благодаря этому удалось избежать длительного изучения точек на плато;
2. подогрели буфер;
3. использовали натриевую соль фруктозобисфосфата ($M = 340 \text{ Da}$) (см 7.1.3).

9.2.1 Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

S [μM]	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

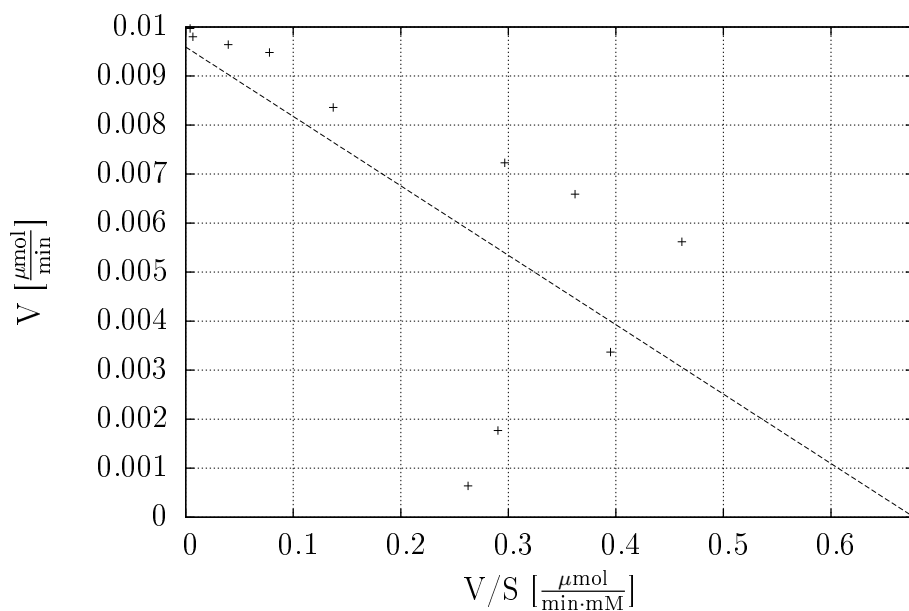
Значение A трех последних точек слишком низкое, что ухудшает графики:

Координаты Лайнуивера-Берка



$$K_m = 160 \mu\text{M}; V_m = 0.0452 \mu\text{mol}/\text{min}$$

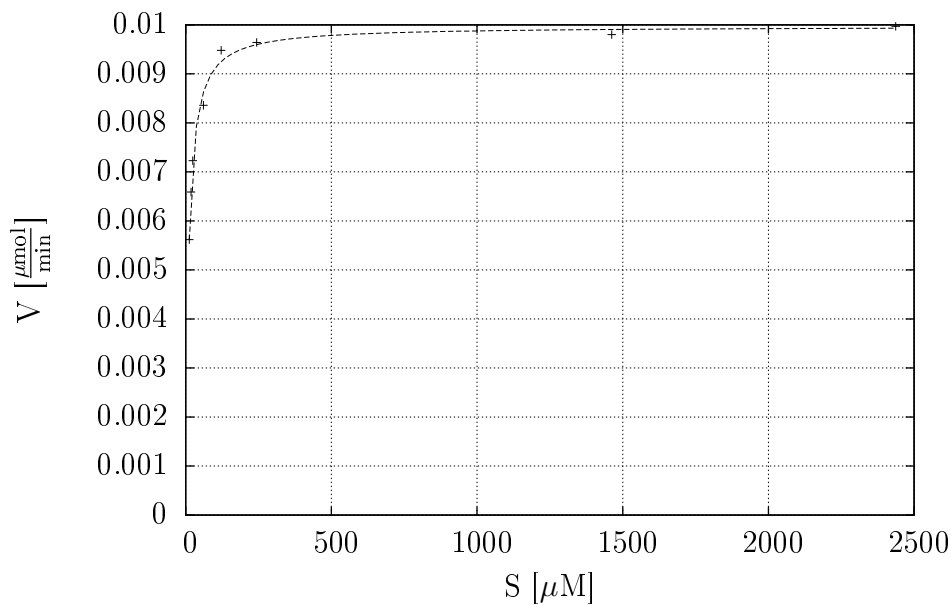
Координаты Еди-Хофсти



$$K_m = 14.2 \mu\text{M}; V_m = 0.00959 \mu\text{mol}/\text{min}$$

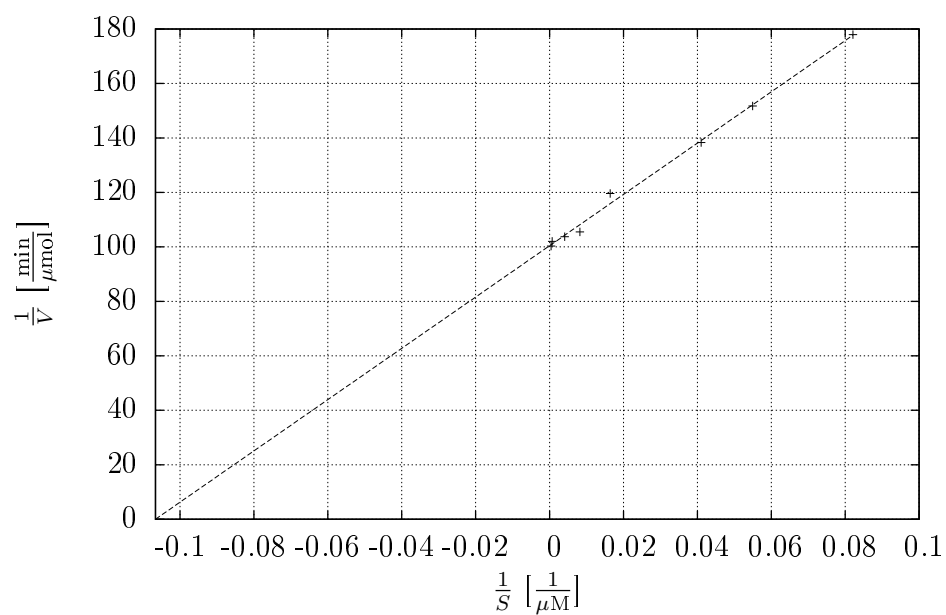
В координатах Еди-Хофсти эти три точки находятся под аппроксимирующей прямой. Если вычеркнуть эти 3 точки, зависимости получаются значительно лучше:

Прямые координаты



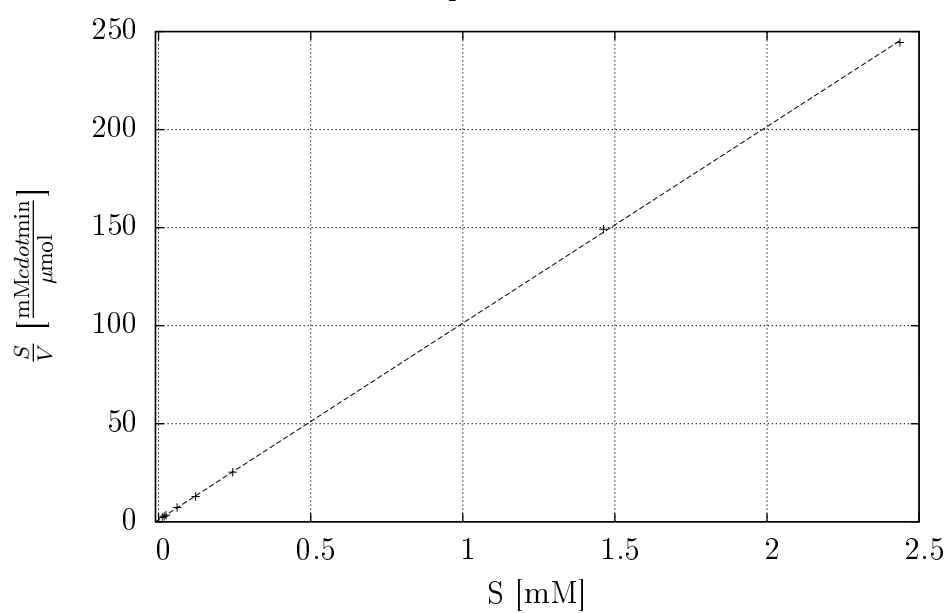
$$K_m = 9.44 \mu\text{M}; V_m = 0.00997 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Координаты Лайнуивера-Берка



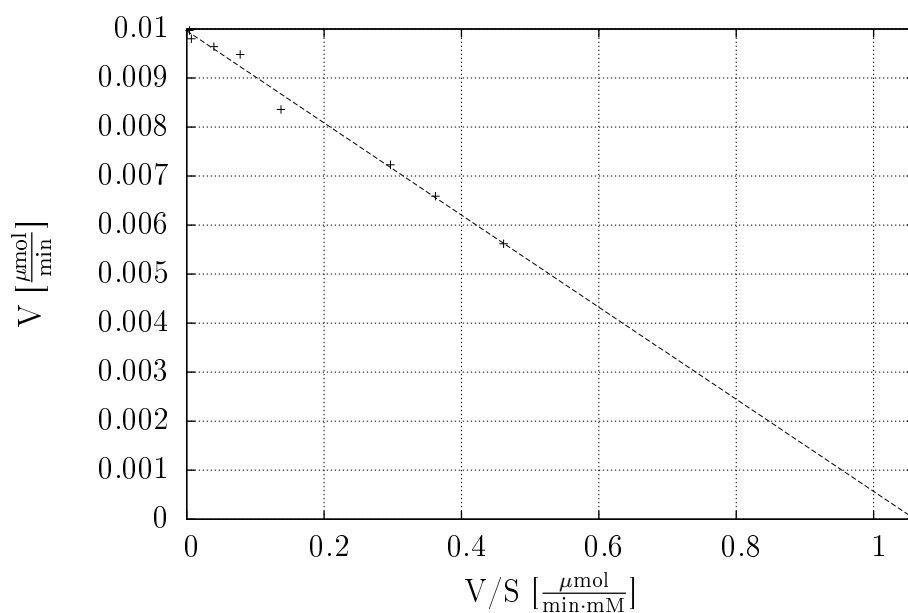
$$K_m = 9.38 \mu\text{M}; V_m = 0.00996 \mu\text{mol}/\text{min}$$

Координаты Хейнса



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

Координаты Еди-Хофсти



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

9.3 Результаты

Координаты	$K_m, \mu\text{M}$	$V_m, \frac{\mu\text{mol}S}{\text{min}}$
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	

9.4 Обсуждение

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

10 Выводы

В данной работе была проведена очистка и частичная характеристика фермента фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы из мышц кролика. Студенты ознакомились с методом экстракции, фракционирования и определения активности ферментного раствора. Характеристику фермента определяли по кинетическим параметрам: измерению активности и определением константы Михаэлиса.

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