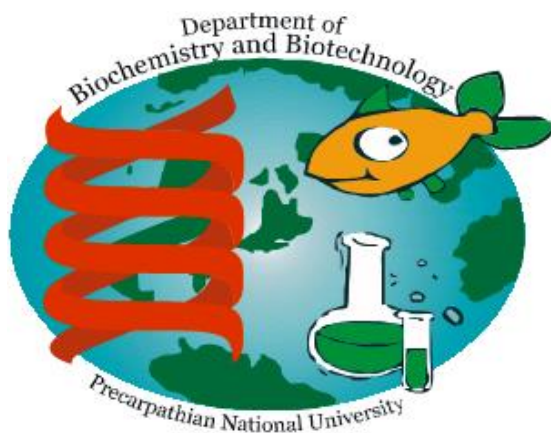


**ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника
Інститут природничих наук**

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З КУРСУ
«ДОСЛІДЖЕННЯ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У
ЖИВИХ ОРГАНІЗМАХ»**



Івано-Франківськ
2014

УДК 577.112.4+577.115.4+577.151.4

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Дослідження вільнорадикальних процесів у живих організмах» / під заг. ред. В.І. Луцака // Методичні вказівки. – Видавництво Прикарпатського національного університету ім. Василя Стефаника, 2014. – 27 с.

Під заг. редакцією д.б.н., проф. Луцака В.І.

Автори-укладачі: к.б.н. Мосійчук Н.М., к.б.н. Абрат О.Б., к.б.н. Байляк М.М., к.б.н., Семчишин Г.М., к.б.н. Кубрак О.І., к.б.н. Гусак В.В., пров. фах. Ровенко Б.М.

У посібнику викладені основні методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дослідження вільнорадикальних процесів у живих організмів. Наведено основні методи визначення показників оксидативного стресу та антиоксидантних ферментів у риб, рослин, пекарських дріжджів та плодової мушки. Описано принципи методів, хід визначення та прописи необхідних реактивів.

*Схвалено до друку Вченою радою Інституту
природничих наук*

© ДВНЗ «Прикарпатський національний
університет імені Василя Стефаника, 2014

РОЗДІЛ 1. ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

Лабораторне заняття №1

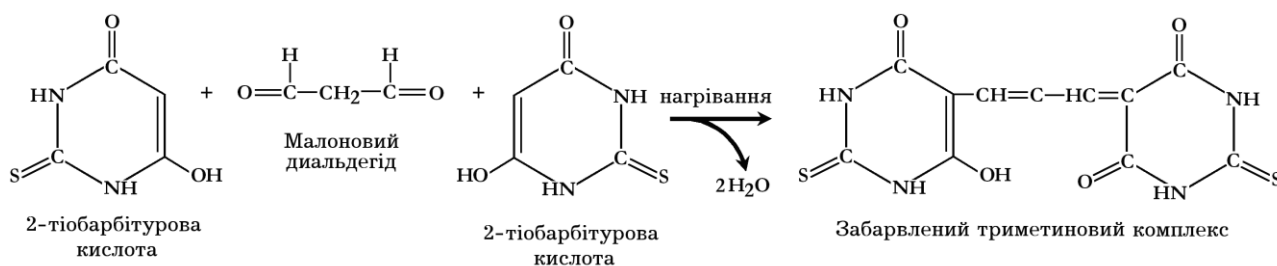
Визначення інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів

В результаті окиснення ненасичених жирних кислот активними формами кисню (АФК) утворюються ліпідні радикали та ініціюється ланцюговий процес пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Основними наслідками ПОЛ є порушення гідрофобності та проникності ліпідного бішару, а також вторинні пошкодження мембранних білків. Кінцевими продуктами ПОЛ є цілий ряд сполук серед яких спирти, кетони, альдегіди і діальдегіди. Деякі з них, наприклад 4-гідрокси-2-ноненал і малоновий діальдегід (МДА), є цитотоксичними, оскільки можуть модифікувати структуру білків та нуклеїнових кислот. Інтенсивність ПОЛ можна оцінити непрямим методом за визначенням кількості утворених кінцевих альдегідних продуктів ПОЛ, зокрема малонового діальдегіду. Для безпосереднього визначення вмісту ПОЛ використовують метод, який базується на окисненні органічними гідропероксидами у кислому середовищі Fe^{2+} до Fe^{3+} .

1) Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Принцип методу

Даний метод оцінки пероксидного окиснення ґрунтується на утворенні забарвлених сполук цих продуктів з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) при кип'ятінні (так звані ТБК-активні продукти – ТБКАП), вміст яких визначається спектрофотометрично при довжині хвилі 535 нм.



Для запобігання розвитку окисних процесів під час цієї процедури додається антиоксидант бутильований гідрокситолуол (БГТ). Для підвищення специфічності методу після кип'ятіння ТБКАП екстрагують бутанолом.

Реактиви:

- 10 % трихлороцтова кислота (ТХО);
- 0,1 % спиртовий розчин БГТ;
- ТБК-реактив (0,65 % ТБК в 20 % ТХО, яка містить 0,01 % БГТ).

Хід роботи

1. Наважку тканини, рослини або заморожених мух розгомогенізувати у 10% ТХО, яка містить 0,01 % БГТ. Вирощені клітини дріжджів осадити (стаціонарна фаза росту, об'єм культури – 80 мл, OD₆₀₀=1,800-1,900), промити 50 мМ калій-фосфатним буфером (pH 7,0), ресуспендувати в 2 мл 10% ТХО, яка містить 0,01 % БГТ, поділити на дві пробірки Eppendorf по 1 мл суспензії. Додати до кожного епендорфу по 0,5 мл скляних кульок

- (діаметр – 500-600 мкл), зруйнувати на вортекс-міксері шляхом вібрації зі скляними кульками протягом 7 хв без охолодження.
2. Отримані гомогенати центрифугувати (10 хв, 7000 об/хв, 4 °C). Супернатанти відібрати у чисті пробірки.
 3. До 1 мл отриманого супернатанту додати 1 мл ТБК-реактиву. Паралельно слід готувати холосту пробу, яка містить 1 мл 10% ТХО+0,01% БГТ замість супернатанту. У роботі з мухами, які мають пігментовані очі, та рослинами готують ще одну додаткову (контрольну) пробу, що містить 1 мл супернатанту і 1 мл 20 % ТХО+0,01 % БГТ.
 4. Проби кип'ятити на водяній бані протягом 30 хв.
 5. Охолодити проби до кімнатної температури.
 6. Перенести вміст проб у пробірки Ерпендорф на 2 мл та довести дистильованою водою до мітки 2 мл.
 7. Центрифугуємо 5 хв при 7000 об/хв.
 8. Супернатант обережно переливаємо в підписані пробірки, нерозчинені частки відкидаємо.
 9. Для підвищення специфічності методу можна провести екстракцію ТБКАП бутанолом. Для цього до отриманого супернатанту (2 мл) додати 2 мл бутанолу. Суміш інтенсивно перемішати та центрифугувати 5 хв при 7000 об/хв. Бутанольний шар обережно відібрати у чисті пробірки.
 10. Визначити оптичну густину проб при $\lambda=532$ нм, в сухій чистій кюветі. Прилад обнулити по повітрі. Між різними пробами промивати водою.

11. Вміст ТБКАП визначити за формулою:

- для тканин тварин і мух:

$$\text{ТБКАП} = \frac{(\text{OD}_\text{д} - \text{OD}_\text{х}) \times V_\text{пр} \times P}{\epsilon_{532} \times V_\text{суп}} \times 1000;$$

- для дріжджів:

$$\text{ТБКАП} = \frac{(\text{OD}_\text{д} - \text{OD}_\text{х}) \times V_\text{пр} \times 1000}{\epsilon_{532} \times Pr} \times 1000;$$

- для рослин оптичну густину проб визначають при довжинах хвиль 532 (поглинання комплексу ТБК-МДА), 600 (поправка на неспецифічне поглинання), 440 нм (поправка на поглинання комплексу ТБК-вуглеводи):

1. $A = (\text{OD}_{532+\text{TBA}}) - (\text{OD}_{600+\text{TBA}}) - (\text{OD}_{532-\text{TBA}} - \text{OD}_{600-\text{TBA}})$
2. $B = (\text{OD}_{440+\text{TBA}} - \text{OD}_{600+\text{TBA}}) \times 0.0571$
3. $\text{TBARs (nmol} \cdot \text{gww}^{-1}) = \frac{(A-B) \times V_\text{х} \times P_\text{х} \times 1000}{\epsilon_{532} \times V_\text{суп}}$

ТБКАП – вміст ТБКАП, нмоль/г сирової маси (для тканин тварин і рослин), нмоль/мг білка;

$\text{OD}_\text{д}$ – оптичне поглинання дослідної проби;

$\text{OD}_\text{х}$ – оптичне поглинання холостої проби;

$V_\text{пр}$ – об'єм проби, мл;

P – розведення;

ϵ_{532} – коефіцієнт молярної екстинції ТБК2-МДА аддукту, $157000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

$V_\text{суп}$ – об'єм супернатанту, мл;

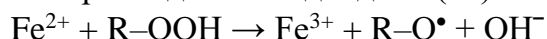
Pr – концентрація білка у супернатанті, мг/ мл.

У дослідах з мухами прилад обнулити по холостій пробі, а у обчисленнях як OD_x – приймати значення контрольної проби.

2) Визначення вмісту пероксидів ліпідів

Принцип методу

Метод визначення вмісту пероксидів ліпідів з Fe(II)/ксиленолом оранжевим базується на тому, що Fe (II) окислюється пероксидами ліпідів до Fe(III).



Fe(III) в комплексі з ксиленолом оранжевим при кислих значеннях рН поглинає світло з максимумом в області 580 нм.

Гідропероксид кумену також здатний окислювати залізо в кислому середовищі. Якщо він додається у відомих концентраціях, його можна використати як внутрішній стандарт. В даному методі вміст пероксидів ліпідів розраховують в еквівалентах гідропероксиду кумену.

Реактиви:

- 96% етанол;
- 4 мМ ксиленол оранжевий (свіжоприготовлений);
- 1 М H₂SO₄;
- 1 мМ FeSO₄·7H₂O (свіжоприготовлений);
- 1 мМ гідропероксид кумену (свіжоприготовлений).

Хід роботи

1. Тканину розгомогенізувати у 96% етанолі (0°C) у співвідношенні 1:5 (мг тканини:мкл спирту). Попередньо зважені і заморожені мухи гомогенізувати у співвідношенні 1:20 (мг мух:мкл спирту). Вирощені клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,0), ресуспендувати в охолодженому 96% етанолі у співвідношенні 1:4 і зруйнувати на вортекс-міксері шляхом вібрації зі скляними кульками протягом 15 хв (почергово - 1 хв руйнування і 1 хв охолодження в льоді).
2. Центрифугувати в закритих пробірках Eppendorf 15 хв, 3000 g 4°C.
3. Супернант акуратно відібрати в чисті пробірки Eppendorf. Виставити на лід (0°C).
4. У ідеально чисті пробірки послідовно додати:

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	Риби	Мухи	Дріжджі	Рослини
Ксиленоловий оранжевий	4 мМ	0,1 мМ	37,5 мкл	37,5 мкл	37,5 мкл	37,5 мкл
H ₂ SO ₄	1 М	25 мМ	37,5 мкл	37,5 мкл	37,5 мкл	37,5 мкл
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 мМ	0,25 мМ	380 мкл	380 мкл	380 мкл	380 мкл
супернатант	-	-	20 мкл	40 мкл ♂ 50 мкл ♀	100 мкл	20 мкл

H ₂ O	-	-	513 мкл*2	502,5 мкл*2 ♂ 498,5мкл*2 ♀	473 мкл*2	513 мкл*2
------------------	---	---	-----------	-------------------------------	-----------	-----------

Всі проби готувати у двох повторах. Одночасно з дослідними пробами готувати холосту пробу (бланк), яка містить аналогічний об'єм спирту замість супернатанту.

- Інкубація 60 хв при кімнатній температурі. Пробірки накрити чистим папером, щоб уникнути потрапляння бруду.
- Визначити оптичну густину проб при $\lambda=580$ нм. Проби акуратно зливати назад у пробірки, повністю кількісно переносючи їх вміст. Кювету щоразу промивати.
- Швидко до 1,5 мл проби додати 7,4 мкл 1 мМ гідропероксиду кумену для повного окислення Fe²⁺ до Fe³⁺. У бланки розчин гідропероксиду кумену не додавати!
- Інкубація 60 хв при кімнатній температурі. Пробірки накрити чистим папером.
- Визначити оптичну густину проб при $\lambda=580$ нм. Кювету щоразу промивати.
- Вміст пероксидів ліпідів (в еквівалентах гідропероксиду кумену) обчислити за формулою (для тканин тварин і рослин):

$$\frac{[\text{CHPeq}], \text{ nmol}}{\text{gww}} = \frac{D_{\text{final}}}{\Delta D} \cdot 4 \cdot \frac{1500}{V_{\text{super}}} \cdot 6$$

$D_{\text{final}} = D_{\text{проби}} - D_{\text{бланку}}$, через 60 хв інкубації;

$D_{\text{кумену}} = D'_{\text{проби}} - D'_{\text{бланку}}$, через 60 хв інкубації з куменом;

$\Delta D = D_{\text{кумену}} - D_{\text{final}}$;

4 нмоль – кінцева концентрація кумену;

V_{super} – кількість супернатанту в пробі, мкл;

1500 – об'єм проби, мкл;

6 – розведення, використане для приготування гомогенатів тканин. У випадку експериментів з мухами у формулу замість розведення 6 слід внести розведення – 21.

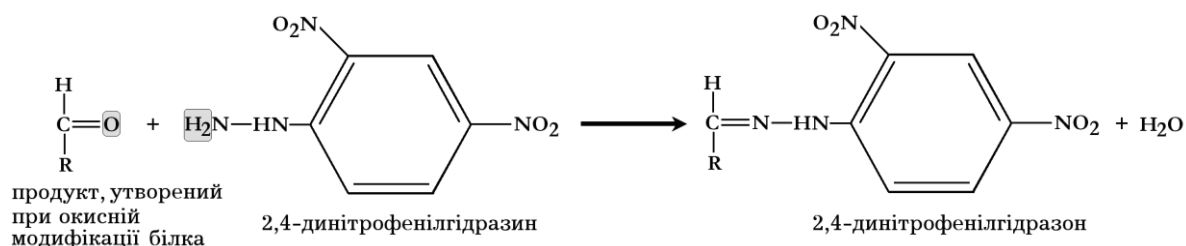
Лабораторне заняття №2

Визначення вмісту карбонільних груп білків

Найпоширенішими клітинними мішенями для АФК є білки. Різні АФК і їх похідні спричиняють специфічні типи пошкоджень окремих амінокислот у поліпептидному ланцюзі. Найбільш розповсюдженою окисною модифікацією білків є утворення додаткових карбонільних груп. Аргінін, пролін, лізин та треонін, які містяться у бічних ланцюгах білків, під дією АФК можуть окислюватися з утворенням додаткових альдегідних чи кетонних груп. Окрім того, карбонільні групи у білках утворюються при взаємодії залишків цистеїну, гістидину та лізину з продуктами пероксидного окислення ліпідів або відновними вуглеводами чи продуктами їх окислення. Вважається, що утворення додаткових карбонільних груп у білках є незворотнім процесом, що призводить до інактивації білків, втрати ними функцій та збільшує чутливість білків до протеолітичної атаки.

Принцип методу

Кількісне визначення карбонільних груп білків ґрунтується на їхній реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ). При цьому утворюються динітрофенілгідрозони, вміст яких визначається спектрофотометрично при довжині хвилі 370 нм.



Реактиви:

- середовище гомогенізації (50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,0; 0,5 мМ ЕДТА);
- 40 % трихлороцтова кислота (ТХО);
- 2М НСІ;
- 10 мМ ДНФГ в 2М НСІ;
- Етанол-етилацетат (Е-ЕА) або етанол-бутилацетат (Е-БА) (суміш 1:1);
- 6 М розчин гуанідин-НСІ.

Хід роботи

1. Тканини розгомогенізувати у середовищі гомогенізації у співвідношенні 1:10 (мг тканини : мкл середовища гомогенізації). Вирощені клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,0), ресуспендувати в середовищі гомогенізації і зруйнувати на вортекс-міксері шляхом вібрації зі скляними кульками протягом 15 хв (почергово - 1 хв руйнування і 1 хв охолодження в льоді).
2. Гомогенати відцентрифугувати, 13 000 об/хв, 15 хв, 4°C.
3. Відібрати кожного супернатанту у 2 пробірки Eppendorf: контрольну і дослідну та додати 40% ТХО (для осадження всіх білків) за наступною схемою:

Об'єкт	Дріжджі		Риби		Мухи		Рослини	
проба	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
V _{супернат. МКЛ}	300	300	250	250	200	200	400	400
V _{ТХО, МКЛ}	300	300	250	250	200	200	400	400

Кінцева концентрація ТХО для повного осадження білків повинна становити 20%.

6. Відокремити осаджені білки центрифугуванням (5 хв, 5000 об/хв, 21 °С).
7. Супернатант злити, струшуючи залишки на фільтрувальний папір.
8. Осади залити:

Об'єкт	Дріжджі		Риби		Мухи		Рослини	
проба	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
V _{10мМ ДНФГ, МКЛ}	-	600	-	500	-	400	-	800
V _{2М НСІ, МКЛ}	600	-	500	-	400	-	800	-

Білковий осад акуратно зішкребти зі стінок і розбити скляними паличками, окремими для дослідних і контрольних проб, палички постійно промивати і витирати фільтрувальним папером.

9. Інкубувати проби разом з розчином ДНФГ чи HCl впродовж 1 год для зв'язування барвника з карбонільними групами білків.
10. Центрифувати, 5 хв 7000 об/хв.
11. Супернатанти акуратно злити, стежачи, щоб не втратити білок.
12. Осади двічі промити 1000 мкл суміші Е-ЕА (чи Е-БА). Для цього після додавання Е-ЕА білок акуратно зішкребти зі стінок скляними паличками і центрифугувати (10 хв, 7000 об/хв, 21 °C).
13. Щоразу супернатанти акуратно зливати, стежачи, щоб не втратити білок.
14. Осади залити 1,3 мл (2×650 мкл) 6 М розчину гуанідин-HCl, для розчинення білків. Закриті пробірки Eppendorf кілька раз перевернути (для кращого розчинення осадів).
15. Інкубувати 0,5 год для розчинення осадів.
16. Центрифугувати 12-15 хв, 8000 об/хв для відділення нерозчинених часточок.
17. Супернатанти обережно перелити в попередньо підписані пробірки, нерозчинені частки осаду викинути.
18. Визначити оптичну густину дослідних проб відносно контрольних при $\lambda=370\text{nm}$, в сухій чистій скляній кюветі. Спочатку визначити оптичну густину контрольних проб, а після них – оптичну густину дослідних проб. Між різними пробами кювету не промивати водою, оскільки розчин гуанідину опалесцює при додаванні води.
19. У контрольних пробах визначити концентрацію загального білка (за методом Бредфорда).
20. Обчислити вміст карбонільних груп білків у перерахунку на мг білка:

$$KB = \frac{(OD_{\text{дослід}} - OD_{\text{контроль}}) \times V_{\text{пр}}}{\epsilon_{370} \times [\text{білок}]} \times 1000 \quad \text{де,}$$

KB – вміст карбонільних груп білків, нмоль/мг білка;

$OD_{\text{дослід}}$ – оптичне поглинання дослідної проби;

$OD_{\text{контроль}}$ – оптичне поглинання контрольної проби;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм гуанідинової проби, мл;

ϵ – коефіцієнт молярної екстинції динітрофенілгїдрозонів, $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

[білок] – концентрація білка в гуанідиновій пробі (мг/мл).

Визначення вмісту загального білка методом Бредфорда

Принцип методу

Метод ґрунтується на здатності білка зв'язуватись з барвником Кумасі яскраво-синім G-250 і утворювати забарвлені у синій колір сполуки ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$). Концентрацію білка в досліджуваних пробах розраховують за допомогою калібрувального графіка, побудованого зі стандартним розчином білка.

Реактиви:

- стандартний розчин білка 0,05 мг/мл;
- розчин Кумасі G-250 (0,005%, 0,05 мг/мл в 3% HClO_4).

Хід роботи

1. Підготувати штатив з пробірками для побудови калібрувального графіка (7 шт) та проб (кожна у 2-ох повторях).

2. Для побудови калібрувального графіка у пробірки послідовно додати:

V H₂O (мкл)	1000	980	960	920	840	760	680
V розчину альбуміну 0,05 мг/мл (мкл)	0	20	40	80	160	240	320
n альбуміну (мкг)	0	1	2	4	8	12	16

3. Одночасно готують досліджувані проби.

	Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
V H₂O (мкл)	980	980	970	950
V супернатанту (мкл)	20	20	30	50

Супернатанти, які використовувалися для визначення активності ферментів, попередньо розвести у 10 разів (10 мкл проби +90 мкл середовища гомогенізації). Кожну досліджувану пробу готувати у двох повторях (дві пробірки).

4. Додати до всіх пробірок по 1 мл (1000 мкл) розчину Кумасі G-250.

5. Інкубація проб з барвником впродовж 10 хв при кімнатній температурі. Час реєструвати з моменту додавання барвника в останню пробірку до проб для побудови калібрувального графіку.

6. Визначити оптичну густину проб при $\lambda=595$ нм (OD_{595}), обнуливши прилад відносно першої проби калібрувального графіку (яка не містить білка).

7. Обчислити концентрацію загального білка у досліджуваних супернатантах за формулою:

$$C(\text{мг/мл}) = \frac{OD_{\text{проби}}}{K \cdot V_{\text{супернатант}}}$$

де, С – концентрація білка в досліджуваній пробі (мг/мл);

$OD_{\text{проби}}$ – оптична густина досліджуваної проби (середнє значення з двох повторів);

K – коефіцієнт калібрувального графіку;

V – об'єм доданого супернатанту, мкл.

Лабораторне заняття №3 Тіолові антиоксиданти

Тіоли – це органічні сполуки, які містять в своєму складі сульфгідрильні групи. Серед доступних антиоксидантів в організмі, тіоли складають основну частину та відіграють важливе значення у захисті від вільних радикалів. Загальні тіоли включають в себе внутрішньоклітинні та позаклітинні тіоли у формі окисленого та відновленого глутатіону, а також тіол-зв'язані білки.

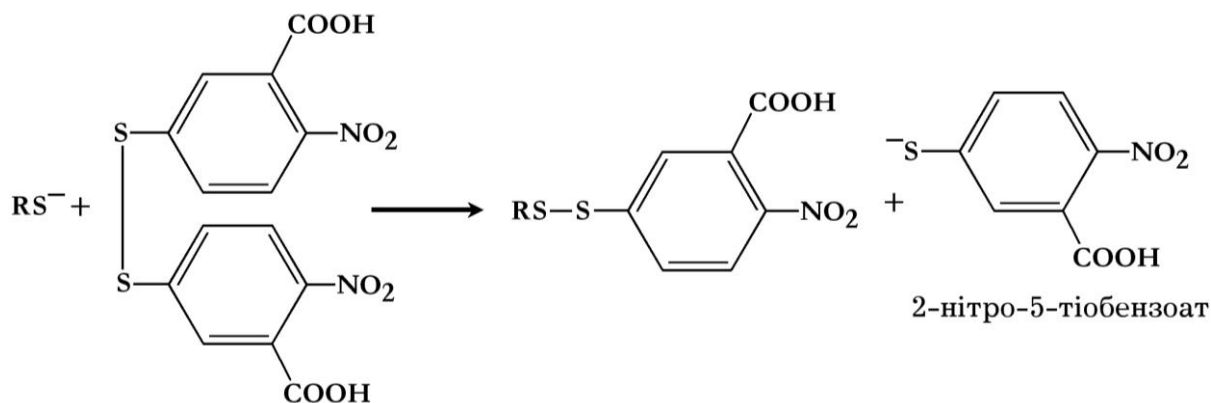
Глутатіон – це трипептид (γ -глутамілцистеїнілглутамін). В клітині він діє як антиоксидант, здатний безпосередньо знешкоджувати АФК. До того ж, він є косубстратом кількох антиоксидантних ферментів, зокрема глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази. Співвідношення відновленого (GSH) і окисленого (GSSG) глутатіону є

показником окисно-відновного стану клітини. Співвідношення ГSH/ГSSG зменшується при оксидативному стресі.

1) Визначення вмісту тіолових груп

Принцип методу

В основі методу визначення вмісту сульфгідрильних груп лежить реакція тіол-дисульфідного обміну:



5,5'-дитіобіс (2-нітробензоат)

В ході реакції вивільнюється аніон 2-нітро-5-тіобензойної кислоти (ДТНБ), який поглинає світло з максимумом при 412 нм. Коефіцієнт молярної екстинкції 2-нітро-5-тіобензоату залежить від рН. Переважно реакцію проводять при лужному рН (8,0–9,0). В цих умовах $\epsilon_{412} = 14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Даний метод в цих умовах специфічний до сульфгідрильних груп і дуже чутливий. Тому він використовується для визначення кількості сульфгідрильних груп у низькомолекулярних тіолах, нативних або денатурованих білках.

Реактиви

- середовище гомогенізації (50 мМ калій-фосфатний буфер (рН=7,0), 0,5 мМ ЕДТА);
- 30% трихлороцтова кислота (ТХО);
- 100 мМ калій-фосфатний буфер, рН=8,0;
- 100 мМ трис-НСІ, рН=9,0;
- 1 мМ ДТНБ (розчиняти в 100 мМ калій-фосфатному буфері, рН=8,0).

Хід роботи

1. Досліджувані тканини розгомогенізувати у охолоджену (4°C) середовищі гомогенізації у співвідношенні 1:10 (мг тканини : мкл середовища гомогенізації). Вирощені клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,0), ресуспендувати в середовищі гомогенізації і зруйнувати на вортекс-міксері шляхом вібрації зі скляними кульками протягом 15 хв (почергово - 1 хв руйнування і 1 хв охолодження в льоді).
2. Центрифугувати в закритих епендорфах: 4°C, 15 хв, 13000 об/хв.
3. Супернатанти акуратно відібрати в чисті пробірки Eppendorf. Виставити на холод (0-4°C).
4. Для визначення низькомолекулярних тіолів білки слід осадити. Для цього до 140 мкл супернатанту додати 70 мкл ТХО 30% (w/w) (співвідношення 2:1).
5. Центрифугувати в закритих епендорфах: 4°C, 5 хв, 13000 об/хв.

6. Супернатанти, змішані з ТХО, акуратно відібрати в чисті пробірки Eppendorf. Виставити на холод (4°C).
7. Для визначення вмісту загальних тіолів у пробірки послідовно додати:

Компонент	Риби	Мухи	Дріжджі	Рослини
Калій-фосфатний буфер (100 мМ, рН=8,0)	688 мкл*2	693 мкл*2	688 мкл*2	688 мкл*2
ДТНБ (1 мМ)	75 мкл	75 мкл	75 мкл	75 мкл
супернатант	50 мкл	40 мкл	50 мкл	50 мкл

Одночасно приготувати холосту пробу, яка містить аналогічний об'єм середовища гомогенізації замість супернатанту.

8. Інкубація 30 хв при кімнатній температурі.
9. Для визначення вмісту низькомолекулярних тіолів у пробірки послідовно додати:

Компонент	Риби	Мухи	Дріжджі	Рослини
Трис-НСІ буфер (100 мМ, рН=9,0)	675 мкл*2	683 мкл*2	675 мкл*2	675 мкл*2
ДТНБ (1 мМ)	75 мкл	75 мкл	75 мкл	75 мкл
Супернатант+ТХО	75 мкл	60 мкл	75 мкл	75 мкл

Одночасно приготувати холосту пробу, яка містить аналогічний об'єм середовища гомогенізації замість супернатанту.

10. Інкубація 30 хв при кімнатній температурі.
11. Визначити оптичну густину у пробах в пластиковій кюветі, $\lambda=412$ нм. Обнулення приладу проводити відносно повітря. Після кожної проби кювету промивати дистильованою водою.
12. Вміст загальних та низькомолекулярних тіолів (мкмоль/грам сирової маси) обчислюють за формулою:

$$\frac{[SH], \mu\text{mol}}{g_{\text{WW}}} = \frac{\Delta D \cdot 1500 \cdot 11}{E_{412} \cdot V_{\text{super}}} \cdot 10^3$$

де, $\Delta D = D_{\text{проби}} - D_{\text{бланка}}$. У формулу підставити значення оптичної густини у формі 0,0XX, 1500 – об'єм проби, мкл;

V_{super} – кількість супернатанту в пробі, 50 мкл;

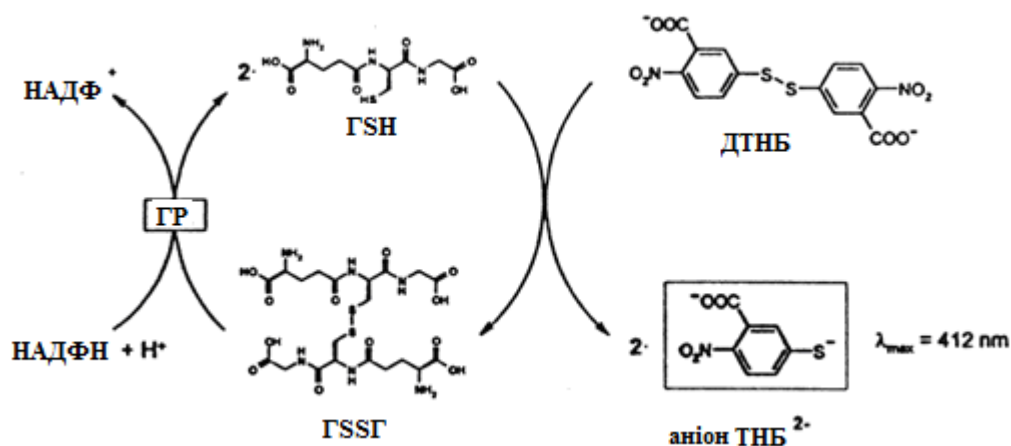
11 – розведення, використане для приготування гомогенатів тканин.

2) Визначення вмісту глутатіону

Принцип методу

Ферментативний метод визначення глутатіону ґрунтується на відновленні 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти глутатіоном, концентрація якого підтримується на сталому рівні завдяки відновленню окисленого глутатіону глутатіонредуктазою в присутності її відновленого кофактору – НАДФН. Протікання спряженої реакції реєструють при довжині хвилі 412 нм (максимум поглинання утвореного аніону 2-тіонітробензойної кислоти). Для визначення вмісту окисленого глутатіону проби

інкубують протягом 1 год в присутності 2-вінілпіридину, який зв'язує відновлений глутатіон.



Реактиви:

- 5 % сульфосаліцилова кислота (ССК);
- 8 М NaOH;
- Вінілпіридин;
- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 6 мМ ДТНБ;
- 25 мМ НАДФН;
- глутатіон редуктаза;
- 40 мкМ відновлений глутатіон;
- 4 мкМ відновлений глутатіон.

Хід роботи

1. Виділені тканини розгомогенізувати у охолодженій (4°C) 5% сульфосаліциловій кислоті (w/v) у співвідношенні 1:5 (мг тканини : мкл 5% сульфосаліцилової кислоти). Гомогенізацію проводити на холоді (льодова баня). Вирощені клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,0), в середовищі гомогенізації. і змішати і з 2,6% сульфосаліциловою кислотою у співвідношенні 1:1; зруйнувати на вортекс-міксері шляхом вібрації зі скляними кульками протягом 3 хв (1 хв руйнування – 1 хв охолодження в льоді – 1 хв руйнування).
2. Центрифугувати в пробірках Eppendorf: 4°C, 10 хв, 13000 об/хв.
3. Супернатанти акуратно відібрати піпеткою в чисті пробірки Eppendorf. Виставити на холод (0-4°C).
4. З отриманих супернатантів відібрати по 200 мкл в інші пробірки Eppendorf та додати відповідний об'єм 8 М NaOH для нейтралізації проб. Об'єм 8 М NaOH завчасно підібрати, щоб рН проб становило 7,0. Після додавання лугу проби перемішувати на вортексі. Інкубація 15 хв, 0-4°C для завершення нейтралізації.
5. Для визначення вмісту окисленого глутатіону одразу після завершення реакції нейтралізації відібрати 120 мкл нейтралізованої проби і додати 4,7 мкл концентрованого вінілпіридину (кінцева концентрація вінілпіридину 4%). Інкубація 1 год, 0-4°C для зв'язування відновленого глутатіону. 2-вінілпіридин надзвичайно токсична речовина! Додавання вінілпіридину та визначення оптичного поглинання проб проводити під витяжною шафою. Використовувати захисні рукавички та маски. Посуд після використання вінілпіридину – викидати.

6. Приготування реакційної суміші згідно таблиці 1, беручи до уваги, що загальний об'єм проби 0,3 мл, з якого – 150 мкл становить суміш, а 150 мкл – вода + препарат. Компоненти суміші додавати до досягнення концентрацій удвічі вищих за кінцеві, оскільки кінцеві концентрації досягатимуться безпосередньо в плащі при змішуванні суміші та води з досліджуваним препаратом.

Компонент	Кінцева концентрація в пробі	Кінцева концентрація в суміші	Вихідна концентрація	3 мл (~20 проб)
Крі (рН 7,0)	100 мМ	200 мМ	400 мМ	1,5 мл (2×750 мкл)
ЕДТА	1 мМ	2 мМ	50 мМ	120 мкл
ДТНБ	0,6 мМ	1,2 мМ	6 мМ	600 мкл
НАДФН	0,25 мМ	0,5 мМ	25 мМ	60 мкл
ГР	0,5 Од/мл	1 Од/мл		6,6 мкл
H ₂ O				0,71 мл

7. Підготувати проби калібрувального графіку. Для цього додати 4 мкМ (чи 40 мкМ) розчин глутатіону та воду в проби калібрувального графіку згідно нижче наведеної таблиці.

С _{глутатіону} (мкМ)	V _{4 мкМ глутатіону} (мкл)	V _{H₂O} (мкл)
0	0	150
0,48	16	134
0,8	30	120
1,21	45	105
1,6	60	90
3,2	120	30
4,0	150	0

С _{глутатіону} (мкМ)	V _{40 мкМ глутатіону} (мкл)	V _{H₂O} (мкл)
8,0	30	150
12,0	45	105

8. Додати воду і препарати досліджуваних тканини згідно наступної таблиці з урахуванням, що загальний об'єм препарату і води в кожній лунці повинен становити 150 мкл.

Загальний глутатіон

Об'єкт	V препарату (мкл)	V H ₂ O (мкл)
Дріжджі	5	145
Риби	8	142

Окислений глутатіон

Об'єкт	V препарату (мкл)	V H ₂ O (мкл)
Дріжджі	100	50
Риби	100	50

Мухи	20	130		Мухи	100	50
Рослини	10	140		Рослини	100	50

9. Додати в усі проби 150 мкл суміші. Обережно перемішати.
10. Негайно зареєструвати значення оптичної густини при $\lambda=412$ нм перед інкубацією (OD 0 min).
11. Проінкубувати 5 хв. Зареєструвати значення оптичної густини при $\lambda=412$ нм після 5 хв інкубації (OD 5 min).
12. Обчислення:

$$\text{Total GSH } (\mu\text{mol/gww}) = \frac{(\text{OD}_{\min} - b)/\text{coefficient}}{E_{414} \times V_{\text{extract}}(\text{ml})} \times \text{dilution}$$

з урахуванням, що протягом реакції з однієї молекули GSSG утворюється 2 молекули GSH

$$\text{GSSG } (\mu\text{mol/gww}) = \frac{(\text{OD}_{\min} - b)/\text{coefficient}}{E_{414} \times V_{\text{extract}}(\text{ml})} \times \text{dilution} / 2$$

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/gww}) = \text{TotalGSH} - (2 \times \text{GSSG})$$

де, OD_{\min} – це оптична густина проби за хв, обчислена як різниця між оптичними густинами після 1-ї і 5-ї хвилини інкубації, поділена на 5 ($(\text{OD } 5 \text{ min} - \text{OD } 1 \text{ min})/5$).

b – додатковий член рівняння лінійної регресії, отриманого з даних калібрувального графіку ($y=ax+b$, y – оптична густина, x – концентрація);

coefficient – коефіцієнт рівняння лінійної регресії, отриманого з даних калібрувального графіку (a , $y=ax+b$, y – оптична густина, x – концентрація);

E_{414} ($14\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) – коефіцієнт молярної екстинції для аніону 5-тіо-2-нітробензоату;

V_{extract} – об'єм доданого препарату (мл). При обчисленні GSSG врахувати, що супернатант становить тільки 96%;

dilution – загальне розведення тканини, беручи до уваги розведення при гомогенізації та нейтралізації.

$$\text{dilution} = \frac{(V_{\text{SSA}} (\mu\text{l}) + m (\text{mg}))}{m (\text{mg})} \times \frac{V_{\text{supern}} (\mu\text{l}) + V_{\text{NaOH}} (\mu\text{l})}{V_{\text{supern}} (\mu\text{l})}$$

V_{SSA} – об'єм сульфосаліцилової кислоти, використаний для гомогенізації;

m – маса тканини (мг);

V_{supern} – об'єм відібраного супернатанту після центрифугування гомогенату (мкл);

V_{NaOH} – об'єм NaOH, використаного для нейтралізації супернатанту (мкл).

РОЗДІЛ 2. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ТА ПОВ'ЯЗАНИХ З НИМИ ФЕРМЕНТІВ

Правила коректного визначення активності ферментів

1) Правило 1 (мал. А): Для розрахунків активності ферменту слід вибирати діапазон, в якому кількість використаного субстрату (утвореного продукту) – S/P – змінюється протягом часу лінійно.

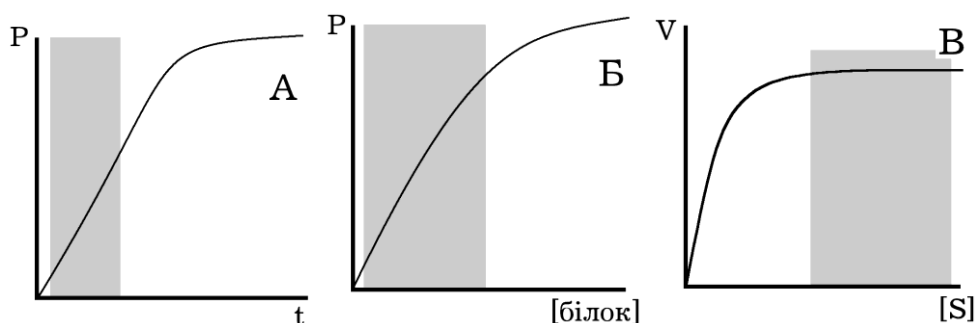
Для цього треба на початку роботи реєструвати швидкість реакції протягом кількох хвилин, щоб вибрати лінійний діапазон зміни оптичної густини в часі. Як правило, швидкість реакції максимальна на початку, а потім поступово знижується, чим порушується лінійність вказаної залежності. Проте є реакції (наприклад, каталізована глутатіонпероксидазою), в яких швидкість реакції зростає з часом. В цих випадках розрахунки ведуть в діапазоні найвищої швидкості реакції.

2) Правило 2 (мал. Б): Розрахунки активності ферменту слід проводити на основі визначень, для яких швидкість реакції (пронормована на використаний об'єм препарату) не залежить від кількості внесеного в суміш препарату.

Для цього необхідно визначити швидкість реакції для кількох (3–4) різних об'ємів препарату і побудувати графік, на осі абсцис якого відкласти об'єми препарату (або вміст білка в ньому), а на осі ординат – зміну оптичної густини за хвилину. Вибирається такий об'єм, який потрапляє в лінійний діапазон графіка.

3) Правило 3 (мал. В): Розрахунки активності ферменту слід проводити на основі визначень, в яких швидкість реакції мало залежить від концентрації субстратів. Як правило, використовують такі концентрації субстратів, які забезпечують 95% від максимальної активності, а концентрації субстратів в ході визначення знижуються не більше, ніж на 10%.

Малюнки, наведені нижче, ілюструють три правила визначення активності ферментів. Сірим кольором позначені ділянки, які використовуються для коректного визначення активності.



Приготування супернатантів

- 1а.** Досліджуваний матеріал (рослини, мухи, рибні тканини) розгомогенізувати у співвідношенні 1:10 (мг тканини : мкл середовища гомогенізації) у середовищі гомогенізації наступного складу (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ).
- 1б.** 10 мл вирощеної культури дріжджів (стаціонарна фаза, 24 год росту) осадити центрифугуванням (3 тис. об./хв., 5 хв), промити 5 мл середовища гомогенізації (50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ) та ресуспендувати в 0,8 мл цього ж середовища гомогенізації. Перенести отриману суспензію дріжджів із центрифужних пробірок в пробірки Ерпендорф місткістю на 2 мл, в які попередньо насипати по 0,4 мл скляних кульок діаметром 500-600 мкм виробництва «Sigma Co». Далі зруйнувати клітини дріжджів шляхом вібрації зі скляними кульками на вортекс-міксері протягом 15 хв у наступному режимі: 1 хв руйнування з наступною 1хв охолодження на льоду (всього 7 циклів руйнування).
- 2.** Гомогенати відцентрифугувати, 13 000 об/хв, 15 хв, 4°C.

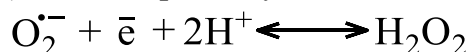
3. Відібрати супернатанти у чисті пробірки Eppendorf. Проби зберігати на холоді.

Лабораторне заняття №4

Визначення активності супероксиддисмутази, каталази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

1) Визначення активності супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза (СОД, супероксид'супероксид-оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1) – фермент першої лінії антиоксидантного захисту, який каталізує реакцію перетворення супероксидного аніон-радикалу ($O_2^{\cdot-}$) до пероксиду водню за наступною схемою:



У рослин відомі три ізоформи СОД, до складу яких входять Cu,Zn-вмісна, Mn-вмісна та Fe-вмісна. Найпоширеніша в клітинах рослин Cu,Zn-СОД, яка виявлена в хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах та цитозолі. Mn-СОД наявна в матриксі мітохондрій і пероксисом, а Fe-СОД локалізована переважно у хлоропластах.

Клітини дріжджів *S. cerevisiae* продукують дві ізоформи СОД – Cu,Zn-вмісну і Mn-вмісну, які кодуються відповідно генами *SOD1* і *SOD2*. Cu,Zn-СОД локалізується, в основному, в цитозолі, але також була виявлена в ядрі та міжмембранному просторі мітохондрій. В аеробній культурі дріжджів Cu,Zn-СОД може репрезентувати до 90% загальної активності ферменту.

У риб можна виділити дві ізоформи СОД: Cu,Zn-СОД, яка локалізується переважно в цитозолі, та Mn-СОД, яка міститься в мітохондріях. Cu,Zn-СОД також була виявлена в ядрі, лізосомах, пероксисомах та міжмембранному просторі мітохондрій.

У плодової мушки, подібно до хребетних тварин, знайдено дві основні форми СОД: марганець-вмісну мітохондріальну (Mn-СОД) і мідь,цинк-вмісну цитозольну (Cu,Zn-СОД), які кодуються генами *sod1* та *sod2* ядерного геному відповідно. Нещодавно було ідентифіковано позаклітинну Cu,Zn-СОД, яка кодується геном *sod3* ядерного геному.

Принцип методу

Даний метод дозволяє визначити сумарну активність СОД і ґрунтується на інгібуванні супероксиддисмутазою реакції окислення кверцетину. Середовище для визначення активності СОД містить ТЕМЕД (*N,N,N',N'*-тетраметилетилендіамін) – сполуку, яка в присутності кисню генерує супероксидний аніон-радикал. При додаванні в цю суміш кверцетину останній окислюється, а швидкість реакції окислення реєструється на спектрофотометрі при довжині хвилі 406 нм. При одночасному додаванні в суміш кверцетину і препарату СОД фермент конкурує з кверцетином за знешкодження супероксид аніон-радикалу, тому реакція окислення кверцетину сповільнюється. Зі збільшенням кількості препарату швидкість окислення зменшується. На основі визначень швидкості реакції при 6-8 різних кількостях препарату будується крива інгібування окислення кверцетину та розраховується константа половинного інгібування (K_{50}), яка дорівнює кількості мікролітрів препарату, при якій швидкість реакції окислення кверцетину зменшується наполовину від вихідної швидкості (без додавання препарату).

Реактиви:

- 90 мМ трис буфер (pH 10,0);

- 50 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА);
- 320 мМ ТЕМЕД;
- 2,5 мМ кверцетин (розчиняти в диметилформаміді).

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності СОД за наступною таблицею. При приготуванні суміші слід враховувати сумарний об'єм супернатанту та кверцетину (тобто відняти його від загального об'єму суміші при обчисленні кількості води) для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші.

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 15 мл
Трис буфер (рН 10,0)	90 мМ	30 мМ	330 мкл	4,95 мл
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	150 мкл
ТЕМЕД	320 мМ	0,8 мМ	2,5 мкл	37,5 мл
H ₂ O			537,5 мкл	13 мл

3. Для побудови кривої інгібування провести визначення швидкості реакції при 8 різних об'ємах супернатанту. Проба об'ємом 1,25 мл, повинна містити: 1100 мкл суміші, 125 мкл води+супернатант, та 25 мкл кверцетину (кінцева конц. 0,05 мМ). Для кожної проби компоненти реакційного середовища додавати у наступній послідовності:

а) Риби

	1	2	3	4	5	6	7	8
V _{суміш} , мкл	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2
V _{супернатант} , мкл	0	1	2	4	8	12	24	36
V _{вода} , мкл	125	124	123	121	117	113	101	89
V _{кверцетин} , мкл	25	25	25	25	25	25	25	25

б) Рослини

	1	2	3	4	5	6	7	8
V _{суміш} , мкл	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2
V _{вода} , мкл	125	123	120	117	115	110	105	95
V _{супернатант} , мкл	0	2,5	5	7,5	10	15	20	30
V _{кверцетин} , мкл	25	25	25	25	25	25	25	25

в) Мухи*

	1	2	3	4	5	6	7	8
V _{суміш} , мкл	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2
V _{супернатант} , мкл	0	1	3	5	10	30	50	75
V _{вода} , мкл	125	124	122	120	115	95	75	50
V _{кверцетин} , мкл	25	25	25	25	25	25	25	25

*подані орієнтовні дані, активність СОД сильно залежить від лінії мух.

г) Дріжджі

	1	2	3	4	5	6	7	8
V _{суміш} , мкл	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2	550*2
V _{вода} , мкл	125	124	122	120	117	113	107	100
V _{супернатант} , мкл	0	1	3	5	8	12	18	25

V _{кверцетин, мкл}	25	25	25	25	25	25	25	25
-----------------------------	----	----	----	----	----	----	----	----

Зміну оптичної густини реєструвати протягом 70 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 406 нм.

- Побудувати криву інгібування окислення кверцетину: по осі абсцис відкласти кількість препарату у мікролітрах, по осі ординат – зміну оптичної густини за хвилину. За допомогою комп'ютерної програми “KINETICS” розрахувати константу половинного інгібування (K_{50}).
- У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда.
- Розрахувати специфічну активність СОД за формулою:

$$A = \frac{1}{K_{50} \cdot [\text{білок}]_{\text{преп}}}$$

де: A – активність, ум.Од/мг білка;

K_{50} – константа половинного інгібування, виражена в мілілітрах;

$[\text{білок}]_{\text{преп}}$ – концентрація білка в препараті, мг/мл.

Специфічна активність показує, скільки одиниць активності знаходиться в 1 мг білка. Одна одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, який інгібує реакцію окислення кверцетину наполовину від максимального інгібування (тобто 1 одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, що міститься в K_{50} мкл препарату тканини).

2) Визначення активності каталази

Каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2\text{:H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) – є тетрамерним гем-вмісним ферментом, який розкладає H_2O_2 до молекулярного кисню та води за наступною схемою:



У рослин каталаза локалізується переважно у пероксисомах та гліоксисомах. Проте у кукурудзи були виявлені три ізоформи каталази, локалізовані у пероксисомах та цитозолі (CAT1, CAT2), а також у мітохондріях (CAT3).

У клітинах *S. cerevisiae* містяться дві форми каталази – каталаза Т, яка локалізована в цитозолі та кодується геном *CTT1*, і каталаза А, яка функціонує в пероксисомах і кодується геном *CTA1*. При вирощуванні *S. cerevisiae* на середовищі з глюкозою пероксисоми в клітинах майже відсутні. Кількість пероксисом значно вища у дріжджів, які ростуть на незброджуваних джерелах вуглецю – етанолі, гліцеролі, оцтовій кислоті та жирних кислотах, таких, як олеїнова чи ліноленова.

У риб каталаза локалізована переважно у пероксисомах, проте невелика кількість її знайдена у мітохондріях.

У плодової мушки диких типів виявлено тільки одну форму каталази в клітині – цитозольну, яка локалізована здебільшого у пероксисомах і кодується в ядерному геномі геном *cat*.

Принцип методу

Метод базується на визначенні швидкості реакції розкладання пероксиду водню каталазою. Зміну оптичного поглинання реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 240 нм (УФ-область) у пробі об'ємом 2 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ H₂O₂ та супернатант. Коефіцієнт молярного поглинання пероксиду водню при вказаній довжині хвилі становить 39,4 М⁻¹см⁻¹.

Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 1М пероксид водню (концентрацію перевірити спектрофотометрично).

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності каталази:

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 16 мл (8 проб)
КФБ (рН 7,0)	400 мМ	50 мМ	125 мкл	2 мл
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	160 мкл
H₂O	-	-	865 мкл	13,84 мл

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
1	V_{суміші}, мкл	980*2	985*2	985*2	980*2
2	V_{супернатанту}, мкл	20	10	10	20
3	V_{H₂O₂}, мкл	20	20	20	20

Оптичну густину реєструвати протягом 70 с з інтервалом 5 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 240 нм.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорд
5. Розрахувати питому активність каталази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\epsilon \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000, \text{ де}$$

A – активність ферменту, Од/мг білка;

$\Delta OD_{\text{хв}}$ – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм проби, мл;

ϵ – коефіцієнт молярної екстинції;

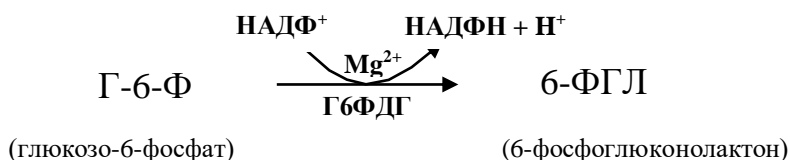
$V_{\text{суп}}$ – об'єм супернатанту, мл;

[білок] – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності каталази приймають таку кількість ферменту, яка перетворює 1 мкмоль пероксиду водню за 1 хвилину в 1 мг білка.

3) Визначення активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази

Глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) є ключовим ферментом пентозо-фосфатного шляху, який каталізує реакцію окислення глюкозо-6-фосфату (Г-6-Ф) до 6-фосфоглюконолактону (6-ФГЛ). При цьому відбувається відновлення НАДФ⁺ до НАДФН.



НАДФН використовується глутатіон редуктазою для підтримування рівня відновленого глутатіону у клітині. Тому, Г6ФД є важливим ферментом у захисті клітини від окисних пошкоджень.

У рослин Г6ФДГ виявлена у цитозолі та пластидах. У риб Г6ФДГ має димерну структуру, а у багатьох видів наявний поліморфізм по кудуючому локусу.

У плодової мушки Г6ФДГ кодується геном Zw, локалізованому в X-хромосомі. У зв'язку з цим існує суттєва різниця в рівнях активності цього ферменту у самців і самок. Є виключно цитозольним ферментом.

Принцип методу

Метод базується на визначенні швидкості реакції відновлення НАДФ⁺ до НАДФН. Зростання оптичної густини реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ Г-6-Ф, 0,2 мМ НАДФ та супернатант. Реакція проводиться у присутності йонів Mg²⁺. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при вказаній довжині хвилі становить 6220 М⁻¹см⁻¹.

Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 20 мМ MgCl₂;
- 200 мМ глюкозо-6-фосфат;
- 20 мМ НАДФ.

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази:

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 10 мл (8 проб)			
				Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
Крі	400 мМ	50 мМ	125 мкл	1,25 мл (625*2)			
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	100 мкл			
MgCl ₂	100 мМ	5 мМ	50 мкл	500 мкл			
Гл-6-фосфат	200 мМ	2 мМ	10 мкл	100 мкл			
НАДФ	20 мМ	0,2 мМ	10 мкл	100 мкл			
H ₂ O, мл	-	-	-	7,65 мл	7,79 мл	7,75 мл	7,35 мл
Супернатант	-	-	-	30мкл*8	20 мкл*8	25 мкл*8	75 мкл*8

Супернатант у суміш не додається, проте його об'єм віднімається при приготуванні суміші для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші.

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
1	V _{суміші} , МКЛ	610*2	615*2	613*2	588*2
2	V _{супернатанту} , МКЛ	30	20	25	75

Оптичну густину реєструвати протягом 90 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорд

5. Розрахувати питому активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\varepsilon \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000, \text{ де}$$

A – активність ферменту, Од/мг білка;

$\Delta OD_{\text{хв}}$ – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм проби, мл;

ε – коефіцієнт молярної екстинції;

$V_{\text{суп}}$ – об'єм супернатанту, мл;

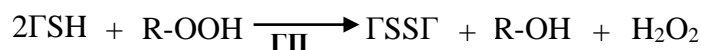
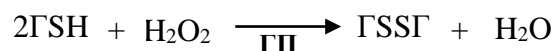
[білок] – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази приймають таку кількість ферменту, яка утворює 1 мкмоль НАДФН за 1 хвилину в 1 мг білка.

Лабораторне заняття №5 Ферменти глутатіонової системи

1) Визначення активності глутатіонпероксидази

Глутатіонпероксидаза (ГП, КФ 1.11.1.9) здійснює детоксикацію пероксиду водню та органічних пероксидів, за участю відновленого глутатіону (GSH):



У рослин глутатіонпероксидаза локалізована в основному в цитоплазмі, а її основною функцією є детоксикація гідроперксидів фосфоліпідів.

У клітинах *S. cerevisiae* виявлено три ізоформи глутатіонпероксидази, які кодуються відповідно генами *GPX1*, *GPX2* і *GPX3*. Глутатіонпероксидаза *GPX3* розглядається як сенсор пероксиду водню у клітинах дріжджів. Глутатіонпероксидазну активність у клітинах дріжджів також можуть проявляти глутаредоксини, які є глутатіонзалежними оксидоредуктазами.

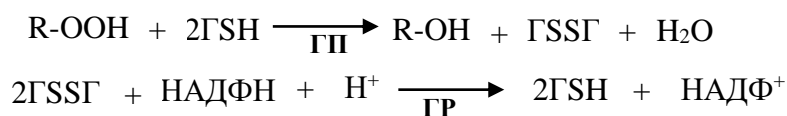
У плодової мушки система глутатіон-залежних ферментів суттєво модифікована. Зокрема, нативна глутатіонпероксидаза, яка кодується геном *grx* ядерного геному, на відміну від такої у ссавців, не має специфічності до глутатіону і працює в клітині, використовуючи як кофактор не лише глутатіон, а навіть більшою мірою тіоредоксин.

Глютатіонпероксидаза у плодової мушки, як і каталаза, є виключно цитозольним ферментом.

У риб існує кілька ізоферментів глютатіонпероксидази, які кодуються різними генами. Глютатіонпероксидаза 1 (GPx1) є найбільш поширеною формою ферменту, і виявлена в цитоплазмі практично всіх тканин риб, субстратом GPx1 є пероксид водню. Глютатіонпероксидаза 4 (GPx4) має велике значення у метаболізмі пероксидів ліпідів та експресується практично у всіх клітинах риб. Глютатіонпероксидаза 2 (GPx2) експресується в кишечнику і є позаклітинним ферментом. GPx3 також є позаклітинним ферментом і в основному зустрічається в плазмі.

Принцип методу

Активність глютатіонпероксидази визначають непрямим методом за спряженою реакцією з глютатіонредуктазою. Окислений глютатіон (GSSG), який утворюється в результаті детоксикації гідропероксидів глютатіон пероксидазою, відновлюється до GSH глютатіонредуктазою (GR) та НАДФН:



Швидкість реакції реєструють за зниженням оптичної густини при 340 нм внаслідок окислення НАДФН до НАДФ⁺. Визначення проводять у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 4 мМ NaN₃, 15 мМ GSH, 0,25 мМ НАДФН, 1 Од/мл ГР, 0,2 мМ H₂O₂ та супернатант. Азид натрію додається в суміш для інгібування каталази, яка також розкладає пероксид водню. Реакцію починають послідовним додаванням ГР, H₂O₂ та супернатанту. Оскільки реакція здатна відбуватися і без участі ферменту паралельно проводять визначення зміни оптичної густини у холостій пробі, яка містить екстракційний буфер замість супернатанту у реакційній суміші. Для розрахунків використовують коефіцієнт молярної екстинції НАДФН 6220 М⁻¹см⁻¹.

Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 40 мМ NaN₃;
- 25 мМ НАДФН;
- 10 мМ H₂O₂;
- глютатіон редуктаза;
- відновлений глютатіон.

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності глютатіонпероксидази:

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 10 мл (8 проб)			
				Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
Kpi	400 мМ	50 мМ	125 мкл	1,25 мл (625*2)			
мклЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	100 мкл			
NaN₃	40 мМ	4 мМ	100 мкл	1 мл			
НАДФН	25 мМ	0,25 мМ	10 мкл	100 мкл			
GSH	порошок	15 мМ	4,66 мг	47 мг			
ГР	-	1 Од/мл	-	-			
H ₂ O ₂	10 мМ	0,2 мМ	-	-			
H₂O	-	-	-	6,15 мл	6,55 мл	6,15 мл	6,15 мл
супернатант	-	-	-	100 мкл *8	50 мкл *8	100 мкл *8	100 мкл *8

ГР, H₂O₂ та супернатант у суміш не додаються, проте їхній об'єм віднімається при приготуванні суміші для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші. Тому окремо готують 4 мл ГР та 2 мл 10 мМ H₂O₂.

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
1	V_{суміші}, МКЛ	538*2	563*2	538*2	538*2
2	V_{ГР}, МКЛ	50	50	50	50
3	V_{H2O2}, МКЛ	25	25	25	25
	V_{супернатанту}, МКЛ	100	50	100	100

Для визначення зміни оптичної густини у холостій пробі (бланк) замість супернатанту додати аналогічну кількість середовища гомогенізації. Оптичну густину реєструвати протягом 90 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда.

5. Розрахувати питому активність глутатіонпероксидази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\epsilon \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000, \text{ де}$$

A – активність ферменту, Од/мг білка;

$\Delta OD_{\text{хв}}$ – зміна оптичного поглинання за 1 хв. $\Delta OD_{\text{хв}} = \Delta OD_{\text{проби}} - \Delta OD_{\text{бланку}}$;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм проби, мл;

ϵ – коефіцієнт молярної екстинції;

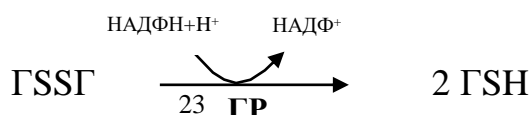
$V_{\text{суп}}$ – об'єм супернатанту, мл;

[білок] – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності глутатіон пероксидази приймають таку кількість ферменту, яка окислює 1 мкмоль НАДФН за 1 хвилину в 1 мг білка.

2) Визначення активності глутатіонредуктази

Глутатіонредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2) каталізує НАДФН-залежне відновлення дисульфідних зв'язків у окисленому глутатіоні:



(глутатіон окислений)

(глутатіон відновлений)

У клітинах *S. cerevisiae* ГР є димерною флавооксидоредуктазою, яка кодується геном *GLR1* і функціонує як в цитозолі, так і в мітохондріях.

У рослин ГР локалізована переважно у хлоропластах (близько 80%). Проте, невелика кількість ізоформ виявлена у мітохондріях, цитозолі та пероксисомах.

У плодової мушки нативної глутатіонредуктази, яка була б гомологічна глутатіонредуктазі у хребтних тварин, не виявлено. Натомість, глутатіонредуктазними властивостями володіють представники тіоредоксинредуктаз. Зокрема, тільки представники одного з класу (I, *trx-1*) тіоредоксинредуктаз виявляють здатність відновлювати глутатіон. Тіоредоксинредуктази класу II (*trx-2*) кодують виключно нативні тіорединсинредуктази, які не можуть відновлювати глутатіон. Знайдені представники цих класів білків як в цитозолі, так і в мітохондріях.

У риб глутіонредуктаза складається з 2 однакових субодиниць з молекулярною масою 50-55 кДа. На одному кінці кожної субодиниці розташований кофермент флавінаденідинуклеотид, на іншому – НАДФН-зв'язуючі ділянки.

Принцип методу

Метод базується на визначенні швидкості реакції окислення НАДФН до НАДФ⁺. Зміну оптичного поглинання реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ГССГ, 0,25 мМ НАДФН та супернатант. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при вказаній довжині хвилі становить 6220 М⁻¹см⁻¹.

Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 25 мМ НАДФН;
- окислений глутатіон.

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти, як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності глутатіонредуктази:

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 10 мл (8 проб)			
				Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
Крі	400 мМ	50 мМ	125 мкл	1,25 мл (625*2)			
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	100 мкл			
ГССГ	порошок	1 мМ	0,625 мг	6 мг			
НАДФН	25 мМ	0,25 мМ	12,5 мкл	125 мкл			
H ₂ O			-	8,285 мл	8,285 мл	8,285 мл	7,725 мл
супернатант			-	30 мкл*8	30 мкл*8	30 мкл*8	100 мкл*8

Супернатант у суміш не додається, проте його об'єм віднімається при приготуванні суміші для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші.

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
1	V _{суміші} , МКЛ	610*2	610*2	610*2	575*2
2	V _{супернатанту} , МКЛ	30	30	30	100

Оптичну густину реєструвати протягом 90 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм. Оскільки фермент відзначається низькою активністю, рекомендується реєструвати всі 4 знаки після коми в показках оптичної густини.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда.
5. Розрахувати питому активність глутатіонредуктази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\varepsilon \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000, \text{ де}$$

A – активність ферменту, Од/мг білка;

$\Delta OD_{\text{хв}}$ – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм проби, мл;

ε – коефіцієнт молярної екстинції;

$V_{\text{суп}}$ – об'єм супернатанту, мл;

[білок] – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності глутатіонредуктази приймають таку кількість ферменту, яка окислює 1 мкмоль НАДФН за 1 хвилину в 1 мг білка.

3) Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Глутатіон-S-трансфераза (GST, КФ 2.5.1.18) каталізує кон'югацію відновленого глутатіону з нуклеофільними ксенобіотиками і клітинними компонентами, що були пошкоджені внаслідок дії АФК (наприклад з кінцевими продуктами перекисного окислення ліпідів), здійснюючи їх детоксикацію:



У клітинах *S. cerevisiae* виявлено три білки, які є гомологічними до омега-GSTs людини і кодуються генами *Gto1*, *Gto2* і *Gto3*. Як GST у клітинах дріжджів функціонують також глутаредоксини Grx1 and Grx2.

Рослинні GST задіяні у детоксифікації гербіцидів, гомеостазі гормонів, вакуольному депонуванні антоціанів, метаболізмі тирозину, детоксикації гідропероксидів, регуляції апоптозу та відповіді рослин на дію абіотичних та біотичних стресових факторів. У рослин GST кодуються багатьма генами, зокрема у сої виявили 25 таких генів, у кукурудзи – 42, а у *A. thaliana* – 54.

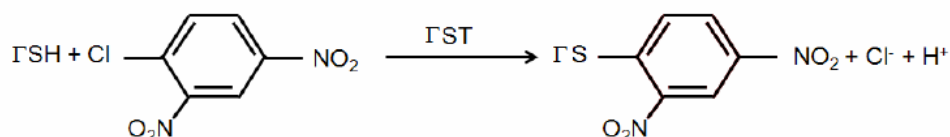
Глутатіон-S-трансферази у дрозоділі – це велика родина ферментів, представлена близько 40 білками шістьох (за іншими даними 10) класів (білки класу дельта, іпсилон, омега, тета, зета та сігма), два з яких (дельта та іпсилон) є специфічними для комах. Відповідно у плодової мушки ідентифіковано щонайменше 11 генів, які кодують Г-S-T. Деякі білкові продукти цих генів не тільки виявляють глутатіон-S-трансферазну, але й глутатіон-пероксидазну активність та працюють як специфічні мітохондріальні транспортери. Усі види Г-S-T у плодової мушки як кофактор можуть використовувати і тіоредоксини.

У риб можна виділити дві родини глутатіон-S-трансфераз: цитоплазматичні і мікосомальні. Крім того, глутатіон-S-трансферази відносять до різних класів,

враховуючи нуклеотидну та білкову послідовності, структурні характеристики. В більшості випадків їх класифікують за кристалічною структурою. Так, у риб виділяють альфа- (A1-A4), пі- (P1) і тета (T1-T2) класи глутатіон-S-трансфераз. Розподіл між ізоформами цих класів є тканино специфічним. Так, у печінці переважають альфа- і тета класи глутатіон-S-трансферази.

Принцип методу

Метод базується на здатності GST каталізувати реакцію кон'югації 1-хлоро-2,4-динітробензену (ХДНБ), субстрату GST, з відновленим глутатіоном (GSH).



Швидкість утворення комплексу динітрофеніл тіоетеру реєструють спектрофотометрично за зростанням оптичної густини при 340 нм. Визначення проводять у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ GSH, 1 мМ ХДНБ та супернатант. Реакцію починають послідовним додаванням супернатанту та ХДНБ. Оскільки реакція здатна відбуватися і без участі ферменту паралельно проводять визначення зміни оптичної густини у холостій пробі, яка містить екстракційний буфер замість супернатанту у реакційній суміші. Для розрахунків використовують коефіцієнт молярної екстинції ХДНБ $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 50 мМ ХДНБ (розчиняти у 96% етанолі);
- відновлений глутатіон.

Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано вище.
2. Приготувати суміш для визначення активності глутатіон-S-трансферази згідно таблиці. Слід зауважити, що ХДНБ та супернатант у суміш не додаються, проте їхній об'єм віднімається при приготуванні суміші для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші. Тому окремо готують 1 мл ХДНБ.

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 10 мл (8 проб)			
				Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
Крі	400 мМ	50 мМ	125 мкл	1,25 мл (625*2)			
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	100 мкл			
GSH	порошок	5 мМ	1,55 мг	15,5 мг			
H₂O	-	-	-	8,634	8,634	8,634	7,85 мл
супернатант	-	-	-	2 мкл*8	2 мкл*8	2мкл*8	100 мкл *8

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Дріжджі	Риби	Мухи	Рослини
1	V суміші, мкл	612*2	612*2	612*2	563*2

2	V _{супернатанту} , мкл	2	2	2	100
3	ХДНБ, мкл	25	25	25	25

Для визначення зміни оптичної густини у холостій пробі (бланк) замість супернатанту додати аналогічну кількість середовища гомогенізації. Оптичну густину реєструвати протягом 90 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда.
5. Розрахувати питому активність глутатіон-S-трансферази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\varepsilon \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000, \text{ де}$$

A – активність ферменту, Од/мг білка;

$\Delta OD_{\text{хв}}$ – зміна оптичного поглинання за 1 хв. $\Delta OD_{\text{хв}} = \Delta OD_{\text{проби}} - \Delta OD_{\text{бланку}}$;

$V_{\text{пр}}$ – об'єм проби, мл;

ε – коефіцієнт молярної екстинції;

$V_{\text{суп}}$ – об'єм супернатанту, мл;

[білок] – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності глутатіон-S-трансферази приймають таку кількість ферменту, яка утворює 1 мкмоль динітрофеніл тіоестеру за 1 хвилину в 1 мг білка.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. Показники оксидативного стресу.....	3
Лабораторне заняття № 1. Визначення інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів....	3
Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	3
Визначення вмісту пероксидів ліпідів	4
Лабораторне заняття № 2. Визначення вмісту карбонільних груп білків	5
Визначення вмісту загального білка методом Бредфорд.....	8
Лабораторне заняття № 3. Тіолові антиоксиданти.....	9
Визначення вмісту тіолових груп	9
Визначення вмісту глутатіону	11
РОЗДІЛ 2. Визначення активності антиоксидантних та пов'язаних з ними ферментів.....	14
Правила коректного визначення активності ферментів	14
Приготування супернатантів.....	14
Лабораторне заняття № 4. Визначення активності супероксиддисмутази, каталази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.....	15
Визначення активності супероксиддисмутази.....	15
Визначення активності каталази.....	17
Визначення активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази.....	19
Лабораторне заняття № 5. Ферменти глутатіонової системи.....	20
Визначення активності глутатіонпероксидази	20
Визначення активності глутатіонредуктази	22
Визначення активності глутатіон-S-трансферази	24

ДЛЯ ПОДАТОК