

Лекція 4. Принципи і методи роботи з ферментами

Питання для розгляду

Методика роботи з ферментами

Техніка роботи при вивченні ферментативної активності

Принципи визначення активності ферментів у біологічному матеріалі.

Вимірювання швидкості ферментативних реакцій

Типи методів, які використовують для вчення ферментативних реакцій (двох крапкові і кінетичні методи)

Методи кількісного вивчення ферментативних реакцій.

Методика роботи з ферментами

Ферменти, як всі білки, є відносно нестійкими речовинами. Вони легко піддаються денатурації та інактивації. Тому при роботі з ними необхідно виконувати певні умови.

При зберіганні об'єкта вивчення понад декілька годин при кімнатній температурі фермент майже повністю інактивується. Тому аналіз визначення активності ферменту слід проводити в можливо короткі терміни. При необхідності тривале зберігання можливо, якщо розчин ферменту висушують із замороженого стану у високому вакуумі (лиофильная сушка) У цьому випадку фермент майже повністю зберігає активність при подальшому його зберіганні при кімнатній температурі. Деякі ферменти добре зберігаються в концентрованих розчинах солей, наприклад, в насиченому сульфаті амонію (процес висолювання) при потребі осад ферменту можна відцентрифугувати і розчинити у фізіологічному розчині або відповідному буфері. Якщо необхідно, від надлишку солі можна позбавитися діалізом.

Необхідно пам'ятати про чутливість ферментів до коливань рН середовища. За невеликим винятком більшість ферментів інактивується в розчинах з рН нижче 5 або вище 9, а оптимум дії ферментів з'являється в зоні декількох одиниць або десятих часток одиниці значення рН. Визначення рН буферних розчинів, використовуваних при роботі з ферментами, рекомендується проводити дуже точно за допомогою рН –метра. Ферменти легко руйнуються сильнодіючими реагентами кислотами, лугами, окислювачами, солями важких металів. Необхідно працювати з хімічно чистими реактивами і бидистиллированою водою, т до навіть невелике забруднення реактивів, особливо домішкою металів, які можуть діяти як модулятори, призводить до зміни активності ферменту.

Техніка роботи при вивченні ферментативної активності

При роботі з ферментами як ніде обов'язково суворе дотримання стандартизації умов дослідження точне витримання температурного і тимчасового режимів, використання реактивів з однієї партії, а при зміні реактивів треба знову відкалібрувати одержувані дані. Якщо розвівається

зabarвлення в кольоровій реакції нестійке в часі, необхідно суворо дотримуватися часу фотометрування.

Рекомендується працювати в умовах достатньої ступеня насичення ферменту субстратом, так як ця обставина істотно позначається на кінцевому результаті, недолік субстрату нівелює відмінності між варіантами. При роботі з ферментами необхідно враховувати органоспецифічні ізоферментний спектр. Часто така специфічність зачіпає умови дії ензиму. На хід реакції може вплинути різне спорідненість до субстрату, інша чутливість до рН, властиві ізоензимами того чи іншого органу або тканини. Переносити метод дослідження активності ферменту з одного об'єкта на інший (наприклад, з сироватки на тканину або з одного органу на інший) потрібно вкрай обережно, з урахуванням всіх відомих даних про фермент і його множинних формах, а також з ретельною перевіркою результатів.

Для широкого впровадження різних біохімічних (ферментативних) реакцій вводиться автоматизація найбільш загальноновизнаних і необхідних аналізів, а також уніфікація і стандартизація лабораторних тестів. Це раціонально і необхідно як для підвищення точності, якості проведення проб, так і для порівняння даних, які отримані в різних лабораторіях.

Загальноприйнятим є й обов'язкове паралельне дослідження, поряд з досліджуваною патологією, фізіологічного контролю - групи практично здорових для встановлення нормальних, фізіологічних коливань. Розуміючи відносність поняття нормальна величина, слід прийняти, що для виявлення відмінностей у патології та оцінки патологічної ознаки, за «норму», як правило, приймається середня арифметична $M \pm 1\sigma$ стилі 2σ (при нормальному гауссова розподілі) залежно від ступеня коливання показника.

Принципи визначення активності ферментів у біологічному матеріалі.

Унікальна властивість ферментів прискорювати хімічні реакції може бути використано для кількісного визначення вмісту цих біокаталізаторів в біологічному матеріалі (тканинному екстракті, сироватці крові і т.д.). При правильно підібраних експериментальних умовах майже завжди існує пропорційність між кількістю ферменту і швидкістю каталізуються реакції, тому по активності ферменту можна судити про кількісний вміст його в досліджуваній пробі.

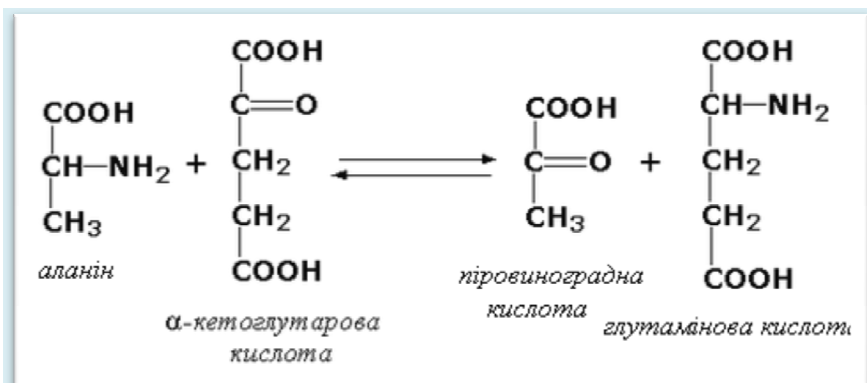
Вимірювання ферментативної активності ґрунтується на порівнянні швидкості хімічної реакції в присутності активного біокаталізатору зі швидкістю реакції в контрольному розчині, в якому фермент відсутній або інактивований.

Досліджуваний матеріал поміщають в інкубаційне середовище, де створені оптимальні температура, рН середовища, концентрації активаторів та субстратів. Одночасно здійснюють постановку контрольної проби, в яку фермент не додають. Через деякий час реакцію зупиняють шляхом додавання різних реагентів (змінюють рН середовища, що викликають денатурацію білків і т.д.) і проводять аналіз проб.

Для того щоб визначити швидкість ферментативної реакції, необхідно знати :

різницю концентрацій субстрату або продукту реакції до і після інкубації ; час інкубації ; кількість матеріалу, взяте для аналізу.

Найбільш часто активність ферменту оцінюють за кількістю утворився продукту реакції. Так чинять, наприклад, при визначенні активності аланінамінотрансферази, що каталізує наступну реакцію:



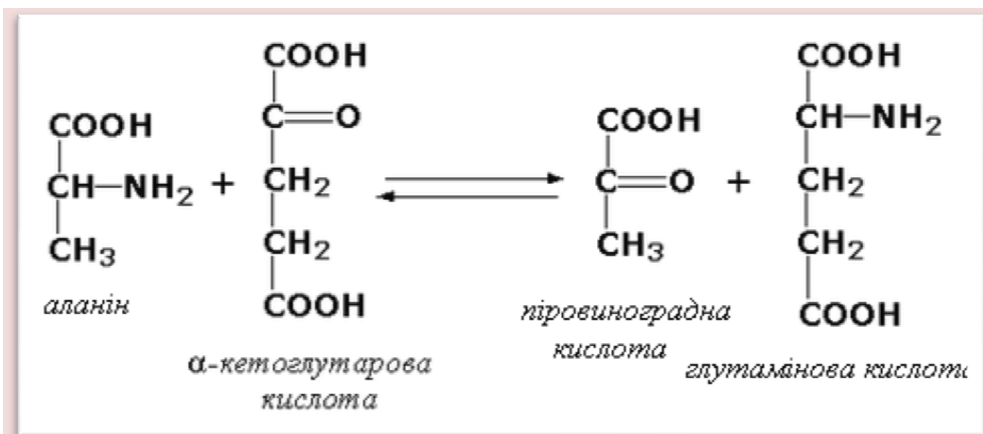
Визначаючи зміст одного з продуктів реакції - піровиноградної кислоти - в пробі після інкубації і віднімаючи з цього значення кількість піровиноградної кислоти в контрольній пробі (до неї досліджуваний матеріал додається після інкубації), знаходять кількість продукту реакції, що утворився за час інкубації.

Активність ферменту можна розраховувати також виходячи з кількості витраченого субстрату. Як приклад можна привести спосіб визначення активності α - амілази - ферменту, що розщеплює крохмаль. Вимірявши вміст крохмалю в пробі до і після інкубації і обчисливши різницю, знаходять кількість субстрату, розщепленого за час інкубації.

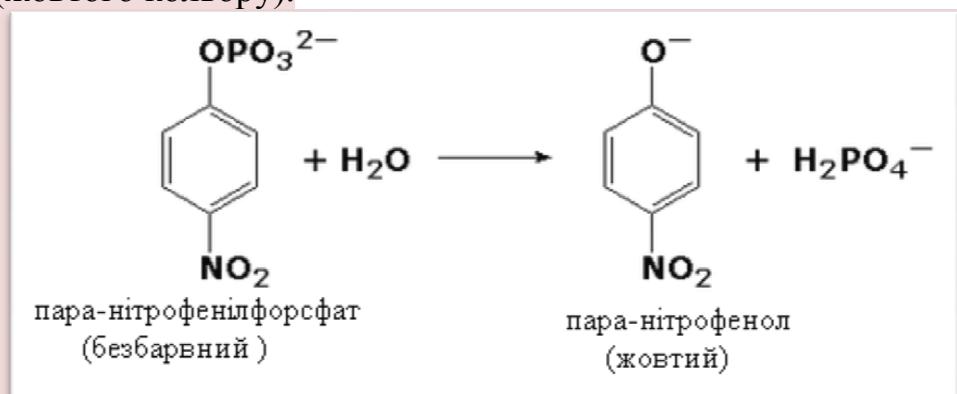
Методи вимірювання активності ферментів

Існує велика кількість методів вимірювання активності ферментів, що розрізняються по техніці виконання, специфічності, чутливості.

Найчастіше для визначення застосовуються фотоелектроколориметричні методи. В основі цих методів лежать кольорові реакції з одним з продуктів дії ферментів. При цьому інтенсивність забарвлення одержуваних розчинів (виміряна на фотоелектроколориметрі) пропорційна кількості утворився продукту. Наприклад, в процесі реакцій, каталізуються амінотрансферами, накопичуються α-кетокислоти, які дають з 2,4- динітрофенілгідразином з'єднання червоно -бурого кольору :



Якщо досліджуваний біокатализатор має низьку специфічну дію, то можна підібрати такий субстрат, в результаті реакції з яким утворюється забарвлений продукт. Прикладом може служити визначення лужної фосфатази - ферменту, широко поширеного в тканинах людини, його активність у плазмі крові істотно змінюється при захворюваннях печінки і кісткової системи. Цей фермент в лужному середовищі гідролізує велику групу фосфорнокислих ефірів, як природних, так і синтетичних. Одним з синтетичних субстратів є паранітрофенілфосфат (безбарвний), який у лужному середовищі розщеплюється на ортофосфат і паранітрофенол (жовтого кольору).



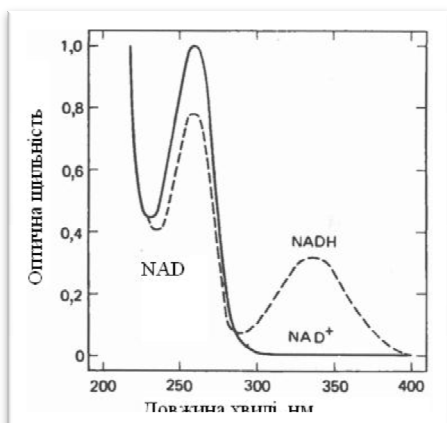
За ходом реакції можна спостерігати, вимірюючи поступово наростаючу інтенсивність забарвлення розчину.

Для ферментів, що володіють високою специфічністю дії, такий підбір субстратів, як правило, неможливий.

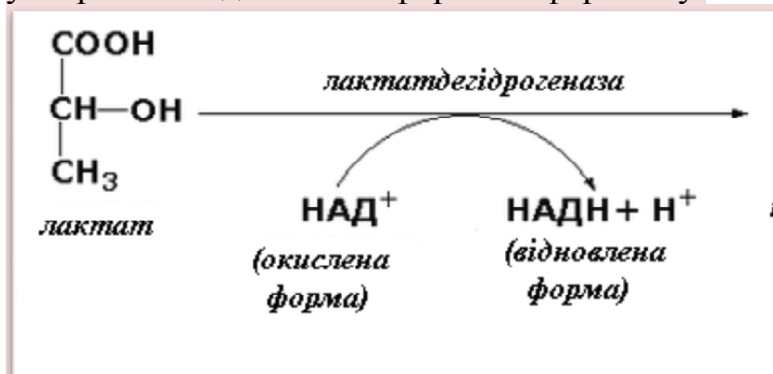
Спектрофотометричні методи засновані на зміні ультрафіолетового спектра хімічних речовин, які беруть участь у реакції. Більшість сполук поглинає ультрафіолетові промені, причому поглинаються довжини хвиль характерні для присутніх в молекулах цих речовин певних груп атомів. Ферментативні реакції викликають внутрімолекулярні перегрупування, в результаті яких змінюється ультрафіолетовий спектр. Ці зміни можна зареєструвати на спектрофотометрі.

Спектрофотометричними методами, наприклад, визначають активність окисно-відновних ферментів, що містять як коферментів НАД або НАДФ. Ці коферменти діють як акцептори або донори атомів водню і, таким чином, або відновлюються, або окислюються в процесах метаболізму. Відновлені форми

цих коферментів мають ультрафіолетовий спектр з максимумом поглинання при 340 нм, окислені форми цього максимуму не мають.



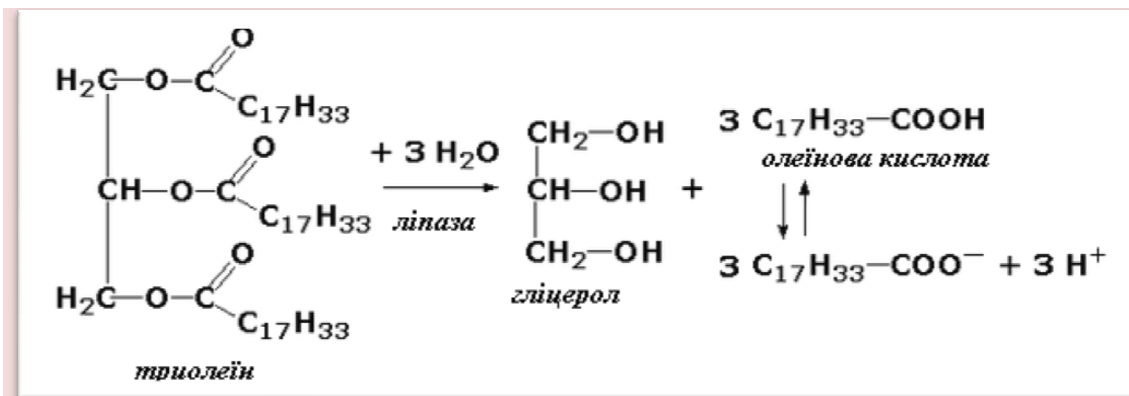
Так, при дії лактатдегідрогенази на молочну кислоту відбувається перенесення водню на НАД, що призводить до збільшення поглинання НАДН при 340 нм. Величина цього поглинання в оптичних одиницях пропорційна кількості утворилася відновленої форми коферменту.



По зміні змісту відновленої форми коферменту можна визначити активність ферменту.

Флюориметричні методи. В основі цих методів лежить явище флюоресценції, яке полягає в тому, що досліджуваний об'єкт під впливом опромінення випромінює світло з коротшою довжиною хвилі. Флюориметричні методи визначення активності ферментів більш чутливі, ніж спектрофотометричні. Порівняно новими і ще більш чутливими є хемілюмінісцентні методи з застосуванням люциферин - люциферазної системи. Такі методи дозволяють визначати швидкість реакцій, що протікають з утворенням АТФ. При взаємодії люциферина (карбонової кислоти складної будови) з АТФ утворюється люцифериладенілат. Це з'єднання окислюється за участю ферменту люциферази, що супроводжується світловим спалахом. Вимірюючи інтенсивність світлових спалахів, вдається визначати кількості АТФ порядку декількох пікомоль (10^{12} моль).

Титриметричні методи. Ряд ферментативних реакцій супроводжується зміною рН інкубаційної суміші. Прикладом такого ферменту є ліпаза підшлункової залози. Ліпаза каталізує реакцію:



Утворені жирні кислоти можуть бути відтитровані, причому кількість лугу, витраченого на титрування, буде пропорційно кількості виділилися жирних кислот і, отже, активності ліпази. Визначення активності цього ферменту має клінічне значення.

Манометричні методи засновані на вимірі в закритому реакційному посуду обсягу газу, що виділився (або поглиненого) в ході ензиматичної реакції. За допомогою таких методів були відкриті і вивчені реакції окислювального декарбоксілювання піровиноградної і α - кетоглутарової кислот, що протікають з виділенням CO_2 . В даний час ці методи використовуються рідко.

Ферменти на відміну від органічних або неорганічних речовин присутні в клітинах в надзвичайно малих кількостях, і визначення їх вмісту в тканинних екстрактах або рідинах представляє особливу проблему. На щастя, вельми чутливі специфічні методи виявилось можливим створити на основі визначення каталітичної активності ферментів.

Щоб оцінити кількість ферменту в пробі тканинного екстракту або біологічної рідини, вимірюють швидкість реакції, що каталізується. Одиниці активності найзручніше виражати в мікромолях (мкмоль, 10^{-6} моль), наномолях (нмоль, 10^{-9} моль) або пікомоль (пмоль, 10^{-12} моль) витраченого субстрату або утворився продукту за одиницю часу (за хвилину). Відповідні міжнародні одиниці активності ферментів позначаються μU , nU , pU .

Общие методы определения активности ферментов

Окислення NADH в NAD (або зворотний процес) супроводжується зміною оптичної щільності (D) розчинів при 340 нм , і за певних умов швидкість зміни D виявляється пропорційна активності

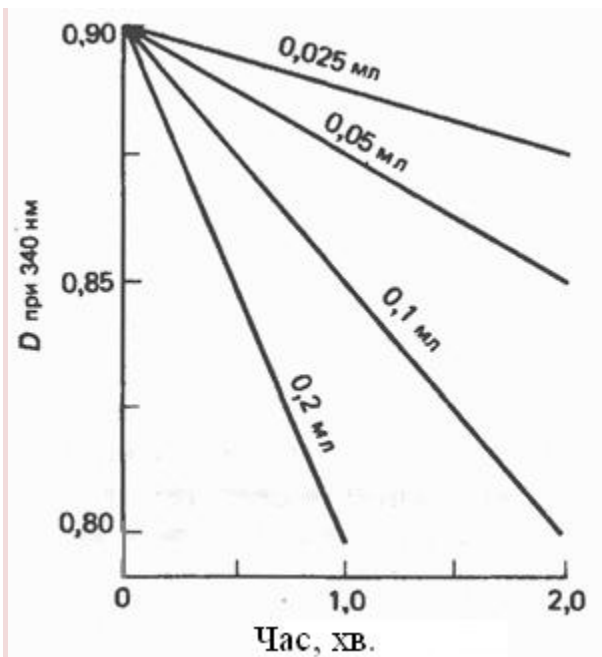
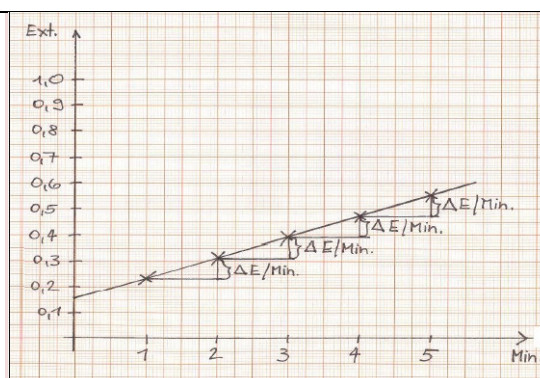
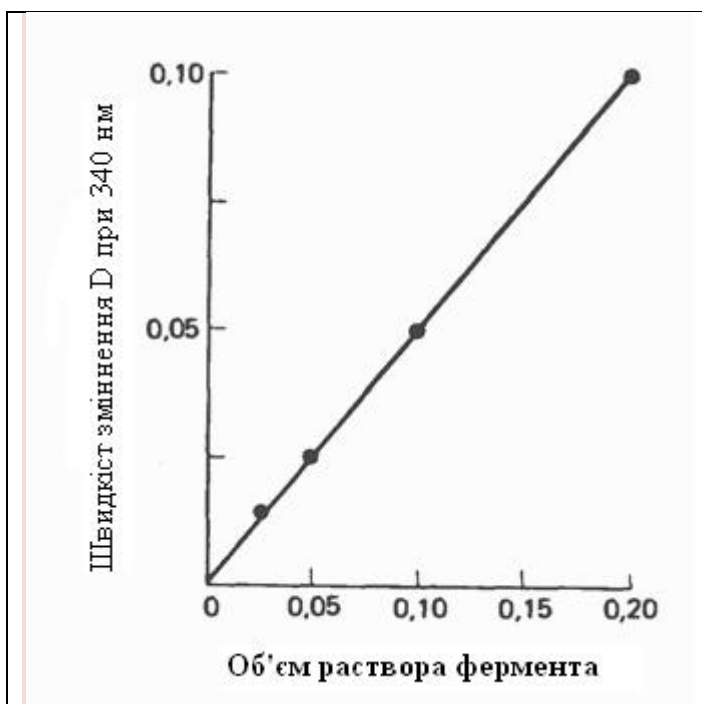


Рис. 2 - Принцип вимірювання активності NADH-або NADPH-залежної дегідрогенази.

Вимірюють швидкість зміни оптичної щільності при 340 нм, обумовленого перетворенням відновленого коферменту в окислену форму. У кювету додають окислений субстрат (S), відновлений кофермент і буфер і реєструють поглинання при 340 нм. Спочатку спостерігається висока оптична щільність через сильне поглинання NADH (або NADPH). При додаванні 0,025, 0,2 мл стандартного розчину ферменту оптична щільність знижується.

Для отримання калібрувальної кривої (рис. 3) будують графік залежності швидкості зміни оптичної щільності (нахилу прямих на рис. 2) від обсягу доданого ферментного препарату.



Важливо! При побудові каліброваних кривих приріст екстинкції за рівні проміжки часу був однаковий.

Рис. 3 – Калібрувальна крива для визначення кількості ферменту. По осі ординат відкладено тангенс кута нахилу прямих, наведених на рис. 2, по осі абсцис - кількість ферменту.

Кількість ферменту, присутнього в досліджуваному розчині, можна знайти за спостереженням швидкості зміни D при 340 нм.


Сполучений ферментний аналіз

У попередньому прикладі оцінка ферментативної активності ґрунтувалася на вимірюванні швидкості утворення продукту (NADH). Швидкість утворення продукту (або, рідше, швидкість витрачання субстрату) можна використовувати для визначення активності не тільки дегідрогеназ, а й інших ферментів. Конкретний метод кількісної оцінки диктується фізико-хімічними властивостями продукту або субстрату. У багатьох випадках буває зручно піддавати дії дегідрогенази продукт реакції, що утворився, для якої цей продукт є субстратом (рис. 4).



Рис. 4 – Визначення активності гексокінази в системі, в якій протікає сполучена ферментативна реакція, каталізується глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою.

Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, глюкоза, ATP, Mg²⁺ і NADP додані в надлишку. У зтих умовах швидкість загальної сполученої реакції залежить



від кількості доданої гексокінази. Цю швидкість визначають за утворенням NADPH, який поглинає світло при 340 нм.

