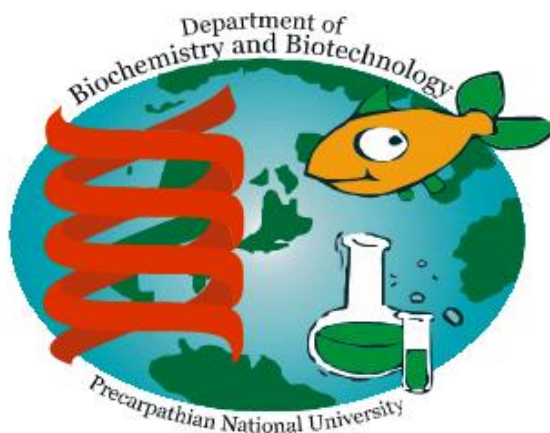


**ДВНЗ «Прикарпатський національний університет  
імені Василя Стефаника»  
кафедра біохімії та біотехнології**

**V КАРПАТСЬКА ЛІТНЯ ШКОЛА**



**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ З  
КУРСУ  
«СУЧАСНА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА БІОЛОГІЯ»**



Івано-Франківськ – 2017

Автори-укладачі: к.б.н. Абрat O.Б., к.б.н. Мосійчук Н.М., к.б.н. Дрогомирецька І.З., к.б.н. Стамбульська У.Я.

У посібнику викладені основні методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з фізіології та біохімії старіння, дослідження стійкості організму до дії стресових чинників, які є важливою передумовою сповільнення старіння та розвитку фізіологічних порушень, вільнорадикальних процесів та визначення метаболічної активності у різних груп живих організмів. Наведено основні методи визначення перелічених показників у плодової мушки, пекарських дріжджів, риб та мишей. Описано принципи методів, хід визначення та прописи необхідних реактивів.

**Рецензенти:**

Доцент кафедри біохімії та біотехнології ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», к.б.н. Байляк Марія Михайлівна

Доцент кафедри біохімії та біотехнології ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», к.б.н. Господарьов Дмитро Валерійович

Затверджено на засіданні кафедри біохімії та біотехнології ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника» (протокол № 26 від 20 червня 2017 року)

*Схвалено до друку Вченою радою Інституту природничих наук (протокол №6 від 20.06.2017 року)*

© ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, 2017

## ВСТУП

Дослідження особливостей адаптації живих організмів до несприятливих умов досі залишається однією з найпопулярніших галузей сучасної експериментальної біології. Це зумовлено тим, що підвищення стійкості організму до дії стресових чинників є важливою передумовою сповільнення старіння і розвитку фізіологічних порушень.

Серед несприятливих факторів, які з кожним роком інтенсивніше впливають на сучасне суспільство, не тільки ті, що вважаються вимушеними шкідливими факторами довкілля, але й, до прикладу, різноманітні ліки та харчові компоненти, впливу яких сучасна людина піддається невимушено. До потенційно шкідливих для організму людини агентів належать вуглеводи у надлишкових кількостях, харчові консерванти у вигляді слабких органічних кислот тощо.

Відомо, що оксидативний стрес часто супроводжує дію несприятливих чинників. Стратегія боротьби зі старінням та різноманітними хворобами людини часто ґрунтується на стимуляції антиоксидантної системи. Проте існує достатньо експериментальних свідчень щодо прооксидантних властивостей багатьох екзогенних антиоксидантів. Зокрема виявлено, що за певних умов низькомолекулярні антиоксиданти можуть брати безпосередню участь в утворенні вільних радикалів та активованих форм кисню (АФК) і таким чином сприяти неферментативним процесам окислення. Це, ймовірно, є одним з пояснень доведеної у переважній більшості випадків неефективності антиоксидантної терапії. Крім того, участь і координація механізмів захисту, зокрема антиоксидантної системи, в адаптації організмів до різних стресових умов та в процесі старіння залишається недостатньо вивченою.

Таким чином, дослідження маркерів старіння, показників оксидативного стресу і метаболізму – три сторони магічного трикутника сучасної експериментальної біології. У запропонованих методичних вказівках частково наведено основні методи визначення перелічених показників у різних груп живих організмів.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЗАА – загальна антиоксидантна активність  
ABTS – 2,2'-азино-біс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонат  
Trolox – 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота  
КБФ – калій-фосфатний буфер  
ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид  
ЕДТА – натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти  
ТХО – трихлороцтова кислота  
АФК – активовані форми кисню  
СОД – супероксиддисмутаза  
МПО – мієлопероксидаза  
ЛДГ – лактатдегідрогеназа  
ПОЛ – пероксидне окислення ліпідів  
ДНФГ – 2,4-динітрофенілгідразин  
ДТНБ – 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота  
Е-ЕА – етанол-етилацетат  
КБ – карбонільні групи білків

## ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №1

### ОЦІНКА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАНУ У РІЗНИХ ГРУП ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ

#### I. Визначення загальної антиоксидантної активності за знешкодженням катіон-радикалу ABTS<sup>•+</sup>

Для узагальненої оцінки потужності антиоксидантного захисту часто використовують такий показник, як загальна антиоксидантна активність (ЗАА). Цей показник характеризує сумарну здатність всіх наявних у досліджуваному зразку молекул антиоксидантів знешкоджувати вільні радикали чи відновлювати окислені біомолекули. Одним з методів оцінки ЗАА є визначення швидкості знешкодження антиоксидантами катіон-радикалу ABTS<sup>•+</sup>, максимум оптичного поглинання якого знаходиться при довжинах хвиль 420, 660 і 740 нм. ABTS<sup>•+</sup> радикал генерується внаслідок взаємодії 2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонату) (ABTS) з H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ацетатному буфері (рН 3,6) при витримуванні протягом 1 год в темряві за кімнатної температури (до появи характерного темно-зеленого кольору ABTS<sup>•+</sup>). У присутності антиоксидантів забарвленій ABTS<sup>•+</sup> відновлюється до вихідної безбарвної форми ABTS. Швидкість реакції калібрується за Тролоksom (Trolox, 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоною кислотою), який є водорозчинним аналогом вітаміну Е. Значення ЗАА виражаються у Тролоксівих одиницях.

#### **Реактиви:**

- середовище гомогенізації (50 мМ КБФ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ);
- Реагент 1 (0,4 М ацетатний буфер, рН 5,8);
- Реагент 2 (30 мМ ацетатний буфер, рН 3,6, 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 мМ ABTS);
- 1,616 мМ етанольно-водний розчин Trolox (1 мг розчинити в 0,5 мл 96% спирту, додати 2 мл H<sub>2</sub>O).

*Увага:* всі реагенти зберігаються в холодильнику, реагент 2 при температурі 4°C вважається стабільним протягом 3-6 міс.

#### *Хід роботи*

#### 1. Гомогенізація:

**А)** Досліджуваний матеріал (наважку мух, рослин, тканини риб або мишей) гомогенізувати у охолоджену (4°C) середовищі гомогенізації у співвідношенні 1:10 (мг досліджуваного зразка : мкл середовища гомогенізації);

**Б)** Вирощені у рідкому живильному середовищі клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,0), ресуспендувати у співвідношенні 1:10 (мг дріжджів: мкл середовища) в середовищі гомогенізації і струшувати на вортекс-міксері зі скляними кульками протягом 15 хв (почергово - 1 хв струшування і 1 хв охолодження в льоді).

2. Центрифугувати в закритих пластикових мікропробірках: 4°C, 15 хв, 13000 об/хв.
3. Супернатанти охайно відібрати в чисті пластикові мікропробірки. Виставити на холод (0-4°C).
4. Приготування проб здійснювати у мікропланшетах.

Компонент	На 1 пробу (175 мкл)			
	Мухи	Дріжджі	Риби	Миші
Реагент 1	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл

Супернатант	10 мкл	10 мкл	5 мкл	10 мкл
H <sub>2</sub> O	-	-	5 мкл	-
Реагент 2	15 мкл	15 мкл	15 мкл	15 мкл

5. Паралельно приготувати проби для побудови калібрувальної кривої.

Компонент	Концентрація Trolox, мкМ					
	0	9,2	23	46	69,4	92
Реагент	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл	150 мкл
Стандартний розчин Trolox, 1,616 мМ	0 мкл	1 мкл	2,5 мкл	5 мкл	7,5 мкл	10 мкл
H <sub>2</sub> O	10 мкл	9 мкл	7,5 мкл	5 мкл	2,5 мкл	–
Реагент 2	15 мкл	15 мкл	15 мкл	15 мкл	15 мкл	15 мкл

6. Інкубувати 15 хв при кімнатній температурі у темряві

7. Визначити оптичне поглинання проб у при довжині хвилі 414 нм на мікропланшетному фотометрі.

8. Розрахувати ЗАА за формулами:

$$\text{ЗАА (мМ/еквівалент Trolox/ г.с.м.)} = \frac{(a - OD)}{b \cdot V_{\text{супернатанту}}} \cdot P \text{ – для тканин і мух}$$

$$\text{ЗАА (мМ/еквівалент Trolox /мг білка)} = \frac{(a - OD)}{b \cdot V_{\text{супернатанту}} \cdot [B]} \text{ – для дріжджів}$$

де:

OD – оптичне поглинання дослідної проби;

a, b – коефіцієнти рівняння регресії, яке описує калібрувальну криву;

V<sub>супернатанту</sub> – об'єм супернатанту, мл;

P – розведення при гомогенізації (при гомогенізації 1:10 розведення становить 11)

[B] – концентрація білка в пробі, мг/мл.

## Література

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 2004, 37. P. 277-285.

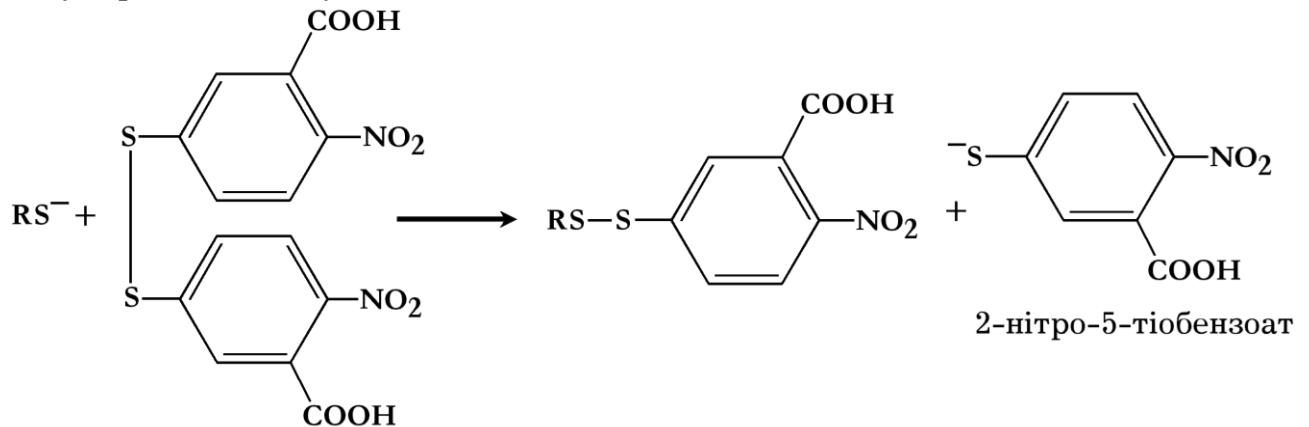
## II. Визначення вмісту тіолових груп

Тіолові (від грецького *théion* сірка) сполуки – це органічні речовини, які містять в своєму складі сульфгідрильні (тіолові) 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-вмісні білки.

Глютаціон – це трипептид ( $\gamma$ -глутамілцистеїнілгліцин). В клітині він діє як антиоксидант, здатний безпосередньо знешкоджувати АФК. До того ж, він є косубстратом кількох антиоксидантних ферментів, зокрема глютаціонпероксидази і глютаціон-S-трансферази. Співвідношення відновленого (GSH) і окисленого (GSSG) глютаціону є показником окисно-відновного стану клітини. Співвідношення GSH/GSSG зменшується при окисативному стресі.

#### Принцип методу

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



5,5'-дитіобіс (2-нітробензоат)

У ході реакції вивільнюється аніон 2-нітро-5-тіобензойної кислоти (ДТНБ), який поглинає світло з максимумом при довжині хвилі 412 нм. Поглинання світла 2-нітро-5-тіобензоатом залежить від рН. Переважно реакцію проводять у лужному середовищі (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 КФБ (рН7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ
- 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 КФБ, рН 8,0).

#### Хід роботи

1. А) Досліджуваний матеріал (наважку мух, рослин, тканини риб або мишей) гомогенізувати у охолоджену (4°C) середовищі гомогенізації у співвідношенні 1:10 (мг досліджуваного зразка : мкл середовища гомогенізації);  
 Б) Вирощені клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ КФБ, ресуспендувати в середовищі гомогенізації і струшувати на вортекс-міксері зі скляними кульками протягом 15 хв (почергово - 1 хв струшування і 1 хв охолодження в льоді).
2. Центрифугувати в пластикових мікропробірках: 4°C, 15 хв, 13000 об/хв.
3. Супернатанти акуратно відібрати в чисті пластикові мікропробірки. 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 пластикових мікропробірках: 4°C, 5 хв, 13000 об/хв.
6. Супернатанти, змішані з ТХО, відібрати ретельно перенести в чисті пластикові мікропробірки. Виставити на холод (4°C).
7. Для визначення вмісту загальних тіолів у пробірці послідовно додати:

Компонент	Мухи	Дріжджі	Риби/Миші	Рослини
<b>Калій-фосфатний буфер (100 мМ, рН 8,0)</b>	693 мкл×2	688 мкл×2	688 мкл×2	688 мкл×2
<b>ДТНБ (1 мМ)</b>	75 мкл	75 мкл	75 мкл	75 мкл
<b>супернатант</b>	40 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл

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

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

Компонент	Мухи	Дріжджі	Риби/Миші	Рослини
<b>Трис-НСІ буфер (100 мМ, рН 9,0)</b>	683 мкл×2	675 мкл×2	675 мкл×2	675 мкл×2
<b>ДТНБ (1 мМ)</b>	75 мкл	75 мкл	75 мкл	75 мкл
<b>Супернатант+ТХО</b>	60 мкл	75 мкл	75 мкл	75 мкл

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

10. Інкубувати 30 хв при кімнатній температурі.
11. Визначити оптичне поглинання 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:

$$[\text{Вміст тіолів}] = \frac{\Delta D \cdot 1500 \cdot 11}{\epsilon_{412} \cdot V_{\text{супернатанту}}} \cdot 10^3,$$

де:

[Вміст тіолів] – вміст загальних та низькомолекулярних тіолів

$\Delta D = D_{\text{проби}} - D_{\text{бланку}}$ . У формулу підставити значення оптичного поглинання у формі 0,0XX,

«1500» – об'єм проби, мкл;

«11» – розведення, використане для приготування гомогенатів тканин.

$V_{\text{супернатанту}}$  – кількість супернатанту в пробі, 50 мкл.



## Література

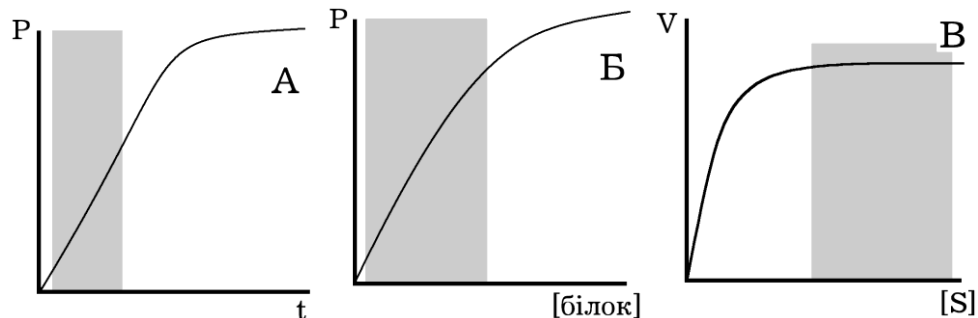
Lushchak O.V., Rovenko B.M., Gospodaryov D.V., Lushchak V.I. *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2011, 160. P. 27–34.

## III. Визначення активності антиоксидантних ферментів

### Правила коректного визначення активності ферментів

1) Правило 1 (мал. А): Для розрахунків активності ферменту слід вибрати діапазон лінійної зміни концентрації субстрату – S (продукту – P) протягом часу.

Для цього треба на початку роботи реєструвати швидкість реакції протягом кількох хвилин, щоб вибрати лінійний діапазон зміни оптичного поглинання з часом. Зазвичай, швидкість реакції є максимальною 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 трьох-чотирьох об'ємів препарату і побудувати графік, на осі абсцис якого відкласти об'єми препарату (або вміст білка в ньому), а на осі ординат – зміну оптичного поглинання за хвилину. Для подальших визначень 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%. Часто вибирають концентрації субстратів у 10 разів більші за константу Міхаеліса.

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

## Приготування супернатантів

### 1. Гомогенізація

А. Досліджуваний матеріал (наважку мух, рослин, тканини риб) гомогенізувати у охолодженому (4°C) середовищі гомогенізації наступного складу (вказано кінцеві

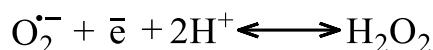
концентрації): 50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ ФМСФ у співвідношенні 1:10 (мг досліджуваного зразка : мкл середовища гомогенізації).

Тканину мишей гомогенізувати в середовищі гомогенізації у співвідношенні 1:20

- Б. 10 мл вирощеної культури дріжджів 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 пластикові мікропробірки місткістю 2 мл, в які попередньо насипати по 0,4 мл скляних кульок діаметром 500-600 мкм виробництва «Sigma-Aldrich Co». Зруйнувати клітини дріжджів шляхом вібрації зі скляними кульками на вортекс-міксері протягом 15 хв у наступному режимі: 1 хв руйнування і 1 хв охолодження на льоду (всього 7 циклів руйнування).
2. Гомогенати відцентрифугувати, 13 000 об/хв, 15 хв, 4°C.
  3. Відібрати супернатанти у чисті пластикові мікропробірки. Проби зберігати на холоді.

#### **А. 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 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 *Sod* (CG11793) та *Sod2* (CG8905) ядерного геному відповідно. Нещодавно було ідентифіковано позаклітинну Cu,Zn-СОД, яка кодується геном *Sod3* (CG9027) ядерного геному.

Клітини дріжджів *S. cerevisiae* продукують дві ізоформи СОД – Cu,Zn-вмісну і Mn-вмісну, які кодуються відповідно генами *SOD1* (YGR104c) і *SOD2* (YHR008c). 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 відповідати за 90% загальної активності ферменту.

У риб та ссавців можна виділити дві ізоформи СОД: Cu,Zn-СОД (кодується геном *SOD1*), яка локалізується переважно в цитозолі, та Mn-СОД (кодується геном *SOD2*), яка міститься в мітохондріях. Cu,Zn-СОД також була виявлена в ядрі, лізосомах, пероксисомах та міжмембранному просторі мітохондрій.

#### *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'*-тетраметилетиленадіамін) – 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 супероксиддисмутази фермент конкурує з кверцетином за супероксид аніон-радикал, тому реакція окислення кверцетину сповільнюється. Зі збільшенням кількості препарату швидкість окислення кверцетину зменшується через зниження концентрації супероксид аніон-радикалу. 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 мкл препарату, при якій швидкість реакції окислення кверцетину зменшується наполовину від вихідної швидкості (без додавання препарату).

**Реактиви:**

- 90 мМ Трис-буфер (рН 10,0);
- 50 мМ 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 концентрація	Кінцева концентрація	На 1 мл	На 15 мл
Трис буфер (рН 10,0)	90 мМ	30 мМ	330,0 мкл	4,950 мл
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10,0 мкл	0,150 мл
ТЕМЕД	320 мМ	0,8 мМ	2,5 мкл	37,500 мл
H <sub>2</sub> O			537,5 мкл	13,000 мл

3. Для побудови кривої інгібування визначити швидкість реакції при восьми 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) Мухи\***

	1	2	3	4	5	6	7	8
V <sub>суміш</sub> , МКЛ	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2
V <sub>супернатант</sub> , МКЛ	0	1	3	5	10	30	50	75
V <sub>вода</sub> , МКЛ	125	124	122	120	115	95	75	50
V <sub>кверцетин</sub> , МКЛ	25	25	25	25	25	25	25	25

\*подано орієнтовні дані, оскільки активність СОД відрізняється у різних ліній плодової мушки.

**б) Дріжджі**

	1	2	3	4	5	6	7	8
V <sub>суміш</sub> , МКЛ	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2
V <sub>вода</sub> , МКЛ	125	124	122	120	117	113	107	100
V <sub>супернатант</sub> , МКЛ	0	1	3	5	8	12	18	25
V <sub>кверцетин</sub> , МКЛ	25	25	25	25	25	25	25	25

**в) Рослини\***

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>V<sub>суміш</sub>, МКЛ</b>	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2
<b>V<sub>вода</sub>, МКЛ</b>	125	123	120	117	115	110	105	95
<b>V<sub>супернатант</sub>, МКЛ</b>	0	2,5	5	7,5	10	15	20	30
<b>V<sub>кверцетин</sub>, МКЛ</b>	25	25	25	25	25	25	25	25

\*подано орієнтовні дані, підібрані на верхівкових листках кукурудзи, оскільки активність СОД відрізняється у різних рослин.

**г) Риби**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>V<sub>суміш</sub>, МКЛ</b>	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2
<b>V<sub>супернатант</sub>, МКЛ</b>	0	1	2	4	8	12	24	36
<b>V<sub>вода</sub>, МКЛ</b>	125	124	123	121	117	113	101	89
<b>V<sub>кверцетин</sub>, МКЛ</b>	25	25	25	25	25	25	25	25

**д) Миші**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>V<sub>суміш</sub>, МКЛ</b>	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2	550×2
<b>V<sub>супернатант</sub>, МКЛ</b>	0	0,5	1	2	5	10	15	20
<b>V<sub>вода</sub>, МКЛ</b>	125	124	123	121	117	113	101	89
<b>V<sub>кверцетин</sub>, МКЛ</b>	25	25	25	25	25	25	25	25

Зміну оптичного поглинання реєструвати протягом 70 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 406 нм.

4. Побудувати криву інгібування окислення кверцетину: по осі абсцис відкласти кількість препарату у мікролітрах, по осі ординат – зміну оптичного поглинання за хвилину. За допомогою комп'ютерної програми “KINETICS” розрахувати константу половинного інгібування ( $K_{50}$ ).
5. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда.
6. 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).

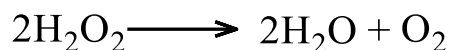
**Література**

Lushchak V., Semchyshyn H., Mandryk S., Lushchak O. Diethyldithiocarbamate inhibits *in vivo* Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast

*Saccharomyces cerevisiae* cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 338. P. 1739-1744.

### **Б. Визначення активності каталази**

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



При цьому одна молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  виступає донором електронів і протонів, тоді як інша – акцептором.

У плодовій мушки диких типів виявлено два ізоферменти, каталази – одна з них кодується геном *Cat* (*CG6871*), а інша, яка синтезується в сім'яниках, кодується геном *CG9314*. Обидва ізоферменти локалізуються в пероксисомах.

У клітинах *S. cerevisiae* містяться дві форми каталази – каталаза Т, яка локалізована в цитозолі та кодується геном *CTT1* (*YGR088w*), і каталаза А, яка локалізується в пероксисомах і кодується геном *CTA1* (*YDR256c*). При вирощуванні *S. cerevisiae* на середовищі з глюкозою їхні клітини містять порівняно невелику кількість пероксисом. Число пероксисом у дріжджів зростає при утилізації незброджуваних джерел вуглецю – етанолу, гліцеролу, оцтової кислоти та, особливо, жирних кислот, таких, як олеїнова чи ліноленова.

У риб та ссавців каталаза локалізована переважно у пероксисомах (кодується геном *CAT1*), проте невелика кількість її знайдена у мітохондріях (кодується геном *CAT2*).

#### *Принцип методу*

Метод ґрунтується на визначенні швидкості реакції диспропорціювання пероксиду водню під дією каталази. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  та супернатант. Коефіцієнт молярного поглинання пероксиду водню при вказаній довжині хвилі становить  $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### **Реактиви:**

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

#### *Хід роботи*

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

Компонент	Вихідна концентрація	Кінцева концентрація	На 1 мл	На 16 мл (8 проб)
КФБ (рН 7,0)	400 мМ	50 мМ	125 мкл	2,00 мл
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	0,16 мл
$\text{H}_2\text{O}$	-	-	865 мкл	13,84 мл

3. У кювету послідовно додати:

№	Об'єкт дослідження	Мухи	Дріжджі	Риби та миші	Рослини
1	V суміші, МКЛ	985×2	980×2	985×2	980×2
2	V супернатанту, МКЛ	10	20	10	20
3	V H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , МКЛ	20	20	20	20

Оптичне поглинання реєструвати протягом 70 с з інтервалом 5 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 240 нм.

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда (методика на с.12)

5. Розрахувати питому активність каталази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD_{\text{хв}} \times V_{\text{пр}}}{\epsilon_{240} \times V_{\text{суп}} \times [\text{білок}]} \times 1000,$$

де:

A – активність ферменту, Од/мг білка;

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

$V_{\text{пр}}$  – об'єм проби, мл;

$\epsilon_{240}$  – коефіцієнт молярної екстинції для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 39,4 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>;

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

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

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

### Література

1. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods in enzymology, 1984, 105. P. 121–126.
2. Nelson D.P., Kiesow L.A. Enthalpy of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). Anal. Biochem., 1972, 72. P. 474–478.

### 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 ( $\lambda_{\text{max}} = 595$  нм). 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<sub>4</sub>).

#### 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:

<b>Об'єм води, мкл</b>	1000	980	960	920	840	760	680
<b>Об'єм розчину альбуміну (0,05 мг/мл), мкл</b>	0	20	40	80	160	240	320
<b>Маса альбуміну (мкг)</b>	0	1	2	4	8	12	16

3. Одночасно готують досліджувані проби. Попередньо супернатант розводять у 10 разів. Кожну досліджувану пробу готувати у двох повторах (дві пробірки).

	<b>Дріжджі</b>	<b>Риби/Миші</b>	<b>Мухи</b>	<b>Рослини</b>
<b>Об'єм води, мкл</b>	980	980	970	950
<b>Об'єм супернатанту, мкл</b>	20	20	30	50

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 графіка.  
 6. Визначити оптичне поглинання проб при довжині хвилі 595 нм (OD<sub>595</sub>), «обнуливши» прилад відносно першої проби калібрувального графіка, яка не містить білка.  
 7. Обчислити концентрацію загального білка у досліджуваних супернатантах за формулою:

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

де:

C – концентрація білка в досліджуваній пробі, мг/мл;

OD<sub>проби</sub> – оптичне поглинання досліджуваної проби (середнє значення з двох повторів);

K – коефіцієнт перерахунку (з калібрувального графіка);

V<sub>супернатанту</sub> – об'єм доданого супернатанту, мкл.

### **Література**

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72. P. 248–254.

## **ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2**

### **ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ТА АКТИВНОСТІ МІСЛОПЕРОКСИДАЗИ У КРОВІ РИБ ТА МИШЕЙ**

#### **I. Визначення гематологічних показників у крові риб та мишей**

Гематологічні параметри – параметри крові – є надзвичайно важливими для дослідження функціонального стану організму за впливу різних факторів. Концентрація гемоглобіну в організмі риб значно менша, ніж у наземних хребетних:

на 1 кг маси тіла у них припадає 0,5-4,0 г гемоглобіну, тоді, як у ссавців цей показник становить до 5-25 г. Кількість гемоглобіну в крові риб залежить від сезону. У коропа вона підвищується взимку і знижується влітку. На цей показник впливає також гідрохімічний режим водойми (у воді з низьким значенням рН, рівним 5,2, кількість гемоглобіну в крові зростає) та умови харчування. Прискорення темпу росту риб корелює з підвищеною забезпеченістю їх організму гемоглобіном. Чутливість риб до змін температури води також пов'язана з властивостями гемоглобіну: при підвищенні температури води потреба організму в кисні збільшується, але здатність гемоглобіну зв'язувати його – знижується. У багатьох морських придонних риб, а також вугра, коропа, карасів і деяких інших гемоглобіну в крові мало, але він може зв'язувати кисень із середовища навіть з незначною його кількістю.

#### **А. Визначення вмісту загального гемоглобіну в крові риб та мишей**

Визначення вмісту загального гемоглобіну проводиться гемоглобінціанідним методом з використанням діагностичної системи ТОВ «Генезіс» (Україна)

##### *Принцип методу*

Гемоглобін крові в присутності окисника і ціанід-аніонів утворює в водному розчині ціанметгемоглобін, забарвлення якого пропорційне вмісту гемоглобіну в крові. Цим методом визначається сумарний вміст всіх форм гемоглобіну за винятком сульфгемоглобіну. **NB!** Реагенти надзвичайно отруйні (містять ціанід-аніони) - працювати виключно в рукавичках, уникати потрапляння реагентів на поверхні столів, посуд. Після роботи – залишки обережно вилити, посуд багаторазово вимити (чи утилізувати).

##### **Реактиви:**

- реагент Драркіна (містить бікарбонат натрію, ферриціанід калію і ціанід калію у співвідношенні 20:4:1, відповідно);
- стандартний розчин.

##### *Хід роботи*

1. Для визначення відібрати 0,02 мл крові, яку відразу поміщаємо у попередньо підготовлену пробірку з реагентом Драркіна для гемолізу (5 мл).
2. Після 20 хв інкубації визначити оптичне поглинання досліджуваної проби та стандартного розчину при довжині хвилі 540 нм.
3. Обчислення концентрації загального гемоглобіну (г/л) здійснити за формулою:

$$[\text{ГЕМОГЛОБІН}] = \frac{\text{ОД}_{\text{проби}}}{\text{ОД}_{\text{станд}}} \times 150$$

де:

[ГЕМОГЛОБІН] – концентрація загального гемоглобіну (г/л);

$\text{ОД}_{\text{проби}}$  – оптичне поглинання досліджуваної проби;

$\text{ОД}_{\text{станд}}$  – оптичне поглинання стандартної проби (визначати проти повітря);

150 – концентрація гемоглобіну в стандартній пробі (г/л);

#### **Б. Підрахунок лейкоцитарної формули крові у риб та мишей**

Одним з етапів дослідження лейкоцитів та інших клітин крові є морфологічне дослідження. Воно включає низку особливостей клітини: величину, форму, забарвлення, властивість ядра, характер включень та інші характеристики. Вивченню



піддаються зафарбовані мазки периферійної крові, пунктати кісткового мозку, лімфатичних вузлів, селезінки тощо.

Імунна система у риб, як і у вищих хребетних, забезпечує саморегуляцію за допомогою безпосереднього контакту клітин (макрофагів, нейтрофілів, цитотоксичних Т-лімфоцитів), а також за допомогою гуморальних факторів (лізоциму, комплементу). Лейкоцити крові риб – група клітин з великою різноманітністю лінійних розмірів (4-20 мкм), різною структурою ядра, цитоплазми і навіть клітинної оболонки. Всі лейкоцити класифікують на основі їх здатності утворювати гранули в цитоплазмі, які виявляються при фарбуванні. У більшості видів риб в крові є гранулярні (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли) і негранулярні (лімфоцити, моноцити) форми лейкоцитів. Серед лейкоцитів переважають лімфоцити, частка яких становить 80-95%, а моноцити складають 0,5-11%. Серед гранулярних форм переважають нейтрофіли – 13-31%; еозинофіли зустрічаються рідко (лише у коропових, амурських рослиноїдних, деяких окуневих). Співвідношення різних форм лейкоцитів у крові коропа залежить від віку та умов вирощування.

Для мікроскопічного аналізу лейкоцитів необхідно приготувати мазки периферійної крові риб та мишей. Фарбування мазків здійснити за Паппенгеймом-Крюковим. Принцип методу ґрунтується на специфічному зафарбовуванні різних частин клітини еозином, метиленовим синім та іншими барвниками. Ядро, яке містить в значній кількості нуклеїнові кислоти, зв'язує переважно основні барвники і є базофільним. Цитоплазма одних клітин крові (наприклад, еритроцитів) – оксифільна, тобто поглинає переважно кислі барвники, інших – базофільна. Цитоплазматичні включення мають різне забарвлення в залежності від спорідненості до того чи іншого барвника.

#### **Реактиви:**

- фарба еозин-метиленовий за Май-Грюнвальдом;
- фарба азур-еозин за Романовським.

#### *Хід роботи*

1. Предметні скельця попередньо знежирити у 96% розчині етилового спирту або суміші Нікіфірова (етанол:етилацетат у співвідношенні 1:1).
2. Приготувати мазки периферійної крові риб та мишей. Для цього невелику краплю крові (~2–3 мм у діаметрі) нанести на предметне скельце (на відстані 1 см від краю) та швидко розтерти шліфувальним склом, поставивши його під кутом 45° до предметного скельця перед краплею крові. Підвівши скло до краплі, почекати поки кров розпливеться вздовж його ребра. Потім одним швидким, легким рухом провести шліфоване скло вперед по всій довжині предметного скла. Правильно зроблений мазок має бути у вигляді комети, тонкий і не доторкатися країв скла. Висушити мазки на повітрі.
3. Фарбування мазків здійснити за Паппенгеймом-Крюковим:
  - 3.1. Попередньо приготувати розчини фарб відповідних концентрацій:
    - фарба Май-Грюнвальда (розчинити у 96%-ому етанолі у співвідношенні 1:3);
    - фарба Романовського-Гімзи (розчинити в дистильованій воді безпосередньо перед використанням (на 10 мл води додати 20 крапель фарби)).
  - 3.2. Фарбу Май-Грюнвальда (~1 мл) помістити на мазок, покриваючи його цілком. Через 40 хв фарбу змити водою.
  - 3.3. Рівномірно нанести барвник Романовського-Гімзи (~1 мл), покриваючи скло цілком. Через 20 хв фарбу змити водою, мазки висушити.

4. Цитологічний аналіз провести під світловим мікроскопом використовуючи імерсійний об'єктив при збільшенні  $\times 1000$ . При цьому для кожного мазка проаналізувати відносний вміст різних видів лейкоцитів (%) на 200 клітин.

### **В. Підрахунок кількості еритроцитів у крові риб та мишей**

Практично у всіх видів риб, на відміну від ссавців, еритроцити мають ядро. Вони мають овальну (або близьку до такої) форму з поздовжнім діаметром від 8 мкм у щуки до 14 мкм у карася. Кількість еритроцитів у риб коливається в широких межах, що, насамперед, залежить від рухливості риб, пори року та віку. Так, у коропа кількість еритроцитів становить 0,84-1,89 млн./мм<sup>3</sup> крові, а у щуки – 2,08 млн./мм<sup>3</sup> крові.

Підрахунок еритроцитів в крові риб та мишей провести за допомогою лічильної камери Горяєва.

#### **Реактиви:**

- 3 % NaCl;
- антикоагулянт.

#### *Хід роботи*

1. Кров свіжу або стабілізовану антикоагулянтном (3,2%-вим розчином цитрату натрію або 10-50 Од/мл гепарину) розвести в 200 разів. Для цього беремо 4 мл 3 % NaCl та додаємо 20 мкл крові.
2. Перед заповненням камери Горяєва пробірку з кров'ю ретельно перемішати.
3. Заповнити камеру розведеною кров'ю. В горизонтальному положенні камеру розміщуємо на предметному столику мікроскопа і підраховуємо кількість еритроцитів в 5 великих квадратах (квадрати вибирають такі, щоб було приблизно однакове число еритроцитів) з малим збільшенням.
4. Розрахунок здійснити за формулою:

$$EP/\text{мкл крові} = n \times A / (V \times 5 \times 16),$$

де:

EP/мкл крові – кількість еритроцитів в мкл крові;

n – сума підрахованих еритроцитів у 5 квадратах;

A – кратність розведення (200);

5 – кількість великих квадратів;

16 – кількість малих квадратів в одному великому квадраті;

V - об'єм 1 маленького квадрату, 1/4000 мм<sup>3</sup>.

### **Г. Підрахунок загальної кількості лейкоцитів у крові риб та мишей**

Особливою відмінністю лейкоцитів крові у риб, порівняно із ссавцями, є їх кількісний вміст. За даними літератури, в 1 мл крові риб лейкоцитів міститься у 5–20 разів більше, ніж у ссавців, що залежить від індивідуальних, видових і вікових особливостей та сезону року.

Лейкоцити крові риб та мишей підраховувати за допомогою лічильної камери Горяєва.

#### **Реактиви:**

- 5% CH<sub>3</sub>COOH, підфарбована метиленовим синім або гентіановим фіолетовим;
- антикоагулянт.

### *Хід роботи*

1. Кров свіжу або стабілізовану антикоагулянтом (3,2%-вим розчином цитрату натрію або 10-50 Од/мл гепарину) розвести в 20 разів для риб, та в 40 разів для мишей. Для цього беремо 400 мкл розчину оцтової кислоти (5%) з метиленовим синім або гентіановим фіолетовим (для зафарбовування лейкоцитів) та 10-20 мкл крові.
2. Перед заповненням камери розведену кров у пробірці ретельно перемішати.
3. Заповнити камеру розведеною кров'ю.
4. В горизонтальному положенні камеру розмістити на предметному столику мікроскопу і підрахувати кількість лейкоцитів в усіх (100) великих квадратах з малим збільшенням.
5. Обчислення здійснити за формулою:

$$\text{ЛЕЙК/мкл крові} = V \times A / (V \times 100 \times 16),$$

де:

ЛЕЙК/мкл крові – кількість лейкоцитів в мкл крові;

V – сума лейкоцитів в 100 великих квадратах;

A – кратність розведення (20);

16 – кількість малих квадратів в одному великому квадраті;

100 – кількість великих квадратів.

V – об'єм 1 маленького квадрату,  $1/4000 \text{ мм}^3$  ( $\text{мм}^3 = \text{мкл}$ ).

### **Література**

1. Анисимова И.М., Лавровский В.В. Ихтиология. М.: Высшая школа, 1983. 255 с.
2. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. Сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб. М., 1983. 184 с.
3. Van Kampen E.J., Zijlstra W.G. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. Clin. Chim. Acta., 1961, 6. P. 538.

## **II. Визначення активності мієлопероксидази у плазмі крові риб та мишей**

Основною функцією мієлопроксидази (МПО) в організмі є захист від зовнішньої інфекції. Після активації фагоцитів відбувається дегрануляція і МПО секретується або всередину фагосоми, або в позаклітинний простір (міжклітинна рідина, кров). Будучи катіонним білком, МПО може зв'язуватися з негативно зарядженою ендотеліальною мембраною і, за наявності субстрату, викликати окислювальні пошкодження тканин організму. При наявності запалення рівень вільної МПО в крові підвищується. У клінічній практиці активність МПО нейтрофілів служить маркером інтенсивності запальних процесів.

### *Принцип методу*

Активність мієлопероксидази у плазмі крові визначити спектрофотометричним методом. Реакція базується на здатності 3,3',5,5'-тетраметилбензидину в присутності мієлопероксидази окислюватися пероксидом водню до оксибензидину коричневого кольору. За зміною інтенсивності забарвлення розчину визначити активність ферменту.

### **Реактиви:**

- розчин Хенкса
- 20 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин гідрохлорид
- 1 М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>
- 4 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- гепарин

### *Хід роботи*

1. Для отримання плазми забрати кров у досліджуваних особин (риб та мишей) у пробірки з антикоагулянтном (гепарин, 10-50 Од/мл). Відцентрифугувати при 2500 об/хв 15 хв при 4°C.
  2. До 10 мкл плазми крові додати 90 мкл розчину Хенкса (досліджувана проба). Контрольна проба повинна містити 100 мкл розчину Хенкса.
  3. У всі проби додати по 35 мкл 20 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидину гідрохлориду. Далі у всі проби додати по 135 мкл 1 М Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. Проби інкубувати 2 хв при кімнатній температурі.
  4. Після інкубації у всі проби одразу внести по 35 мкл 4 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для зупинки реакції.
  5. Визначити оптичне поглинання проб при  $\lambda=450$  нм.
- За одиницю активності мієлопероксидази приймали зміну оптичного поглинання.

### **Література**

Mohanty B. R., Sahoo P. K., Mahapatra K. D. Innate immune responses in families of Indiana major carp, *Labeo rohita*, differing in their resistance to *Edwardsiella tarda* infection // Current science. – 2007. – Vol. 92, N 9. – P. 1270-1274.

## **ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №3**

### **ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ У РІЗНИХ ГРУП ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ**

#### **I. Визначення вмісту глюкози і глікогену**

**Принцип методу.** Принцип визначення вільної глюкози полягає в окисленні глюкози глюкозооксидазою з утворенням еквівалентної кількості пероксиду водню. Пероксид водню, у свою чергу, є субстратом для пероксидази, яка його відновлює шляхом одночасного окислення інших субстратів з утворенням сполуки рожевого кольору. Інтенсивність забарвлення окисленого субстрату колориметрують при довжині хвилі 540 нм і вона пропорційна концентрації глюкози у препараті.

- 1) Глюкоза + Н<sub>2</sub>О + О<sub>2</sub> → Глюконова кислота + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (фермент:  $\beta$ -D-глюкозооксидаза)
- 2) 2Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> + фенол + 4-амінофеназон → 4-(*p*-бензохінономоноіміно)-феназон + 4Н<sub>2</sub>О (фермент: пероксидаза)

Метод колориметричний з використанням діагностичного набору.

#### **Склад набору:**

1. Розчини ферментів:
  - пероксидаза, 2200 Од./л
  - $\beta$ -D-глюкозооксидаза, 18000 Од./л
2. 4-амінофеназон (інша назва – 4-аміноантипирин), 110 мг/л
3. Буферний розчин
  - калій-фосфатний буфер, 50 ммоль/л, рН 7,4
  - фенол, 190+/-19 мл/л
  - стабілізатори
4. Калібрувальний розчин глюкози, 3 мг/мл

## 5. Антикоагулянт

Для визначення вмісту глікогену досліджуваній зразок змішують з відповідною кількістю амілоглюкозидази – ферменту, який розщеплює глікоген до глюкози. Останню визначають за наведеною вище методикою. Для перерахунку на вміст глікогену отриману кількість глюкози множать на коефіцієнт перерахунку, який дорівнює 0,9. Його отримують у такий спосіб: молекулярна маса глюкозного залишку в глікогені дорівнює 162,1, а молекулярна маса глюкози - 180,1. Розділивши 162,1 на 180,1 отримуємо 0,9.

### Хід роботи

1. Приготування зразків:
  - А) Досліджувану тканину гомогенізувати у співвідношенні 1:20 в екстракційному буфері (50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,4 + 0,09%  $\text{NaN}_3$ ).
  - Б) 10 самок або 15 самців плодової мушки попередньо заморожених і зважених гомогенізувати у співвідношенні 1:10 в екстракційному буфері.
2. Зразки помістити на водяну баню ( $70^\circ\text{C}$ ) на 5 хв з наступним охолодження на льоді (5 хв) для осадження білків.
3. Центрифугувати в закритих пластикових мікропробірках:  $21^\circ\text{C}$ , 15 хв, 13000 об/хв.
4. Супернатанти акуратно відібрати в чисті пластикові мікропробірки.
5. Для визначення вмісту глікогену у чистих пластикових мікропробірках змішати 2 мкл супернатанту, 10 мкл амілоглюкозидази (5,5 Од) і 90 мкл води. Перемішати на вортексі та інкубувати 2 год при  $35^\circ\text{C}$ .
6. Після закінчення інкубації приготувати робочий розчин глюкози концентрацією 0,2 мг/мл.
7. Приготувати проби для калібрувальної кривої за наступною схемою:

<b>Кількість глюкози, (мкг/пробу)</b>	0	2	4	8	12	16	20
<b>V станд. р-ну глюкози (мкл)</b>	0	10	20	40	60	80	100
<b>V <math>\text{H}_2\text{O}</math> (мкл)</b>	100	90	80	60	40	20	0

8. Для визначення вмісту глюкози у скляні пробірки додати 20 мкл супернатантів та 80 мкл води.
9. Додати у скляні пробірки (для визначення глюкози) та пластикові мікропробірки (для визначення глікогену) по 500 мкл робочого розчину (містить розчини ферментів та буферний розчин у співвідношенні 1:1). *Увага:* Робочий розчин повинен додаватись одночасно в проби калібрувального графіка та дослідні зразки.
10. Перемішати вміст проб на вортекс-міксері (кожну – впродовж 10 с).
11. Пробі інкубувати 15 хв при  $28^\circ\text{C}$ .
12. Додати в кожен пробу по 700 мкл води, щоб довести об'єм пробі до 1,3 мл.
13. Перемішати вміст проб.
14. Вимірювати оптичне поглинання проб при довжині хвилі 540 нм в пластиковій кюветі. Між пробами кювету промивати. «Обнулити» спектрофотометр відносно першої пробі калібрувального графіка (без глюкози).
15. Обрахувати вміст глюкози в пробах з використанням коефіцієнту лінійної залежності оптичної густини від вмісту глюкози, обчисленого на основі поглинання зразків калібрувальної кривої.

**Для мух** формула розрахунку вмісту глюкози виглядає наступним чином:

$$\text{Вміст глюкози (мкг/особину } D. \text{ melanogaster)} = \frac{OD_s \times V_t}{V_s \times N \times K},$$

де:

ODs – оптичне поглинання проби, вводиться у формі XXX, чи 0,XXX;

Vt – об'єм буферу, взятий для гомогенізації, мкл;

Vs – об'єм розчину супернатанту, отриманого після центрифугування гомогенатів з плодкових мушок, мкл;

N – кількість особин *D. melanogaster*.

K – коефіцієнт лінійної регресії (обчислюється за поглинанням зразків калібрувальної кривої в програмі Microsoft Excel).

Для представлення вмісту глюкози в mM кількість глюкози в калібрувальній кривій (у мкг) повинна бути поділена на молекулярну масу глюкози (180,16).

**Для риб та мишей** формула розрахунку вмісту глюкози у тканинах виглядає наступним чином:

$$[\text{Glucose}] = \frac{oD_{540} \cdot \text{dil}}{k \cdot V_{\text{sup}} \cdot 1000}$$

де:

[Glucose] – вміст глюкози (мг/г тканини);

oD<sub>540</sub> – оптичне поглинання проби;

k – коефіцієнт калібрувального графіка;

V<sub>sup</sub> – об'єм супернатанту (0,02 мл);

dil – розведення (21).

1000 – коефіцієнт перерахунку з мкг в мг.

Для обчислення вмісту глікогену використовують формулу:

$$[\text{Glycogen}] = \frac{oD'_{540} \cdot \text{dil} \cdot 0,9}{k \cdot V_{\text{sup}} \cdot 1000},$$

де:

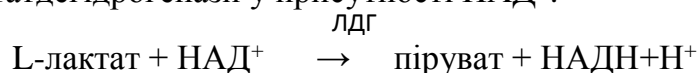
oD'<sub>540</sub> – різниця між оптичними густинами проби для визначення глікогену (з амілоглюкозидазою) та проби для визначення глюкози.

0,9 - коефіцієнт поправки кількості глюкози у глікогені, вводиться тільки для обчислення кількості глікогену.

## **II. Визначення вмісту лактату у тканинах риб та мишей**

Лактат (молочна кислота) – це метаболіт, який утворюється у тваринних організмах при анаеробному (безкисневому) гліколізі під дією ферменту лактат дегідрогенази. В організмі найбільша кількість лактату утворюється в скелетних м'язах, шкірі, головному мозку, серці і еритроцитах. Лактат метаболізується в основному в печінці (60-70%) та нирках (20-30%), у циклі Корі, перетворюючись спочатку до пірувату, а потім до глюкози. Підвищений вміст лактату у тканинах може бути наслідком гіпоксії, а також ряду патологій.

**Принцип методу** визначення полягає у перетворенні L-лактату до пірувату під дією ферменту лактатдегідрогенази у присутності НАД<sup>+</sup>:



Кількість утвореного НАДН визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм. Для кількісного перетворення лактату реакцію слід проводити в лужному

середовищі (рН 9,0) у присутності гідразину, який зв'язує піруват з утворенням гідразонів.

**Реактиви:**

- 0,5 М НСІО<sub>4</sub>;
- 2М КОН;
- Гліцин-гідразинний буфер (рН 9,0);
- Стандартний розчин лактату 6.25 ммоль/л;
- 25 мМ НАД;
- Лактатдегідрогеназа 63 Од/мл.

*Хід роботи*

1. Досліджувану тканину гомогенізувати у 0,5 М НСІО<sub>4</sub> у співвідношенні 1:10 (мг тканини:мкл НСІО<sub>4</sub>). Відібрати 300 мкл гомогенату у чисті пластикові мікропробірки. Проби зберігати на холоді.
2. Центрифугувати 15 хв 13000g 4°C.
3. Відібрати 100 мкл супернатанту у чисті пластикові мікропробірки та додати попередньо підібрану кількість 2М КОН для нейтралізації супернатанту (~15 мкл). Ретельно перемішати проби.
4. Центрифугувати 15 хв 13000g, 4°C.
5. Супернатанти перелити у чисті пластикові мікропробірки і зберігати на льоді.
6. Приготувати проби для калібрувальної кривої за наступною схемою:

Концентрація лактату (ммоль/л)	0	10	20	40	80	120	160
V станд. р-ну лактату (6.25 ммоль/л), мкл	0	2	4	8	16	24	32
V H <sub>2</sub> O (мкл)	50	48	46	42	34	26	18

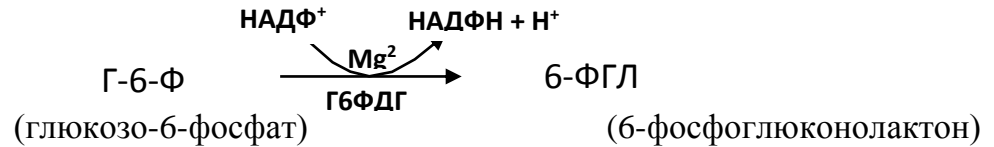
7. У пробірки додати 50 мкл досліджуваної проби.
8. У всі пробірки додати 1060 мкл (2\*530 мкл) гліцин-гідразинного буферу (рН=9,0).
9. У всі пробірки додати по 100 мкл 25 мМ НАД<sup>+</sup> та 40 мкл ЛДГ (2,5 Од).
10. Інкубувати 1 год при кімнатній t.
11. Вимірювати оптичне поглинання проб при довжині хвилі 340 нм в пластиковій кюветі. Між пробами кювету промивати. «Обнулити» спектрофотометр відносно першої проби калібрувального графіка (без лактату).
12. Обрахувати вміст лактату в пробах з використанням коефіцієнту лінійної залежності оптичної густини від вмісту лактату, обчисленого на основі поглинання зразків калібрувальної кривої.

$$C_{\text{lact}} = \frac{oD_{340} \cdot \text{dil}}{V_{\text{sup}} \cdot k}$$

- oD<sub>340</sub> – оптичне поглинання проби;
- k – коефіцієнт калібрувального графіка;
- V<sub>sup</sub> – об'єм супернатанту (0,05 мл);
- dil – розведення.

### III. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

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<sup>+</sup> до НАДФН.



НАДФН використовується глутатіонредуктазою 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 плодовій 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.

Даний фермент відіграє ключову роль в еритроцитах крові живих організмів, оскільки захищає їх від вільнорадикального окислення і таким чином запобігає гемолізу. Недостатня активність Г6ФДГ у еритроцитах зумовлює важкі форми анемії у людей.

#### *Принцип методу*

Метод базується на визначенні швидкості реакції відновлення НАДФ<sup>+</sup> 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 MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ Г-6-Ф, 0,2 мМ НАДФ та супернатант. Реакція проводиться у присутності йонів Mg<sup>2+</sup>. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН при вказаній довжині хвилі становить 6220 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

#### Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 20 мМ MgCl<sub>2</sub>;
- 200 мМ глюкозо-6-фосфат;
- 20 мМ НАДФ.

#### *Хід роботи*

1. Приготувати супернатанти як описано на ст. 7.
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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O, мл	-	-	-	7,65 мл	7,79 мл	7,75 мл	7,35 мл
Супернатант	-	-	-	30мкл*8	20мкл*8	25 мкл*8	75мкл*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 <sub>суміші</sub> , мкл	610*2	615*2	613*2	588*2
2	V <sub>супернатанту</sub> , мкл	30	20	25	75

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

4. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорда (стор. 12).

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, мОд/мг білка;

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

$V_{\text{пр}}$  – об'єм проби, мл;

$\varepsilon$  – коефіцієнт молярної екстинції;

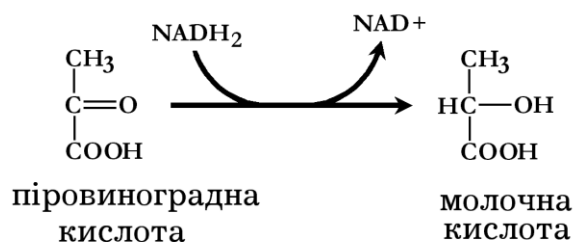
$V_{\text{суп}}$  – об'єм супернатанту, мл;

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

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

#### IV. Визначення активності лактатдегідрогенази

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) – це фермент, який міститься в цитоплазмі клітин нирок, серця, печінки, м'язів, селезінки, підшлункової залози. Коферментом ЛДГ є йони цинку та НАД<sup>+</sup>. ЛДГ бере участь в обміні глюкози, каталізує перетворення лактату (молочної кислоти) в піруват (пировиноградную кислоту) за реакцією:



У сироватці крові можна виявити п'ять ізоформ даного ферменту: ЛДГ1 і ЛДГ2 ізоформи серцевого походження, а ЛДГ3, ЛДГ4 і ЛДГ5 - печінкового походження.

### Принцип методу

Активність ферменту в прямій реакції визначається за зміною концентрації НАДН. Зменшення 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, 1 мМ піруват, 0,25 мМ НАДН та супернатант. Реакція Коефіцієнт молярного поглинання НАДН при вказаній довжині хвилі становить  $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### Реактиви:

- 400 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ, рН 7,0);
- 50 мМ ЕДТА;
- 100 мМ піруват;
- 25 мМ НАДН+H<sup>+</sup>
- 

### Хід роботи

1. Приготувати супернатанти як описано на ст. 7.
2. Приготувати суміш для визначення активності глюкозо-6-фосфат дегідрогенази:

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	На 1 мл	На 10 мл (8 проб)
Крі	400 мМ	50 мМ	125 мкл	1,25 мл (625*2)
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	100 мкл
піруват	100 мМ	1 мМ	10 мкл	100 мкл
НАДФ	25 мМ	0,25 мМ	10 мкл	100 мкл
H <sub>2</sub> O, мл	-	-	845 мкл	8,45 мл

Супернатант у суміш не додається і оскільки його об'єм дуже малий (1-2 мкл), він не віднімається при приготуванні суміші для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші.

3. У кювету послідовно додати 625 мкл\*2 суміші та 2 мкл супернатанту з печінки.
4. Оптичну густину реєструвати протягом 70 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм.
5. У супернатантах визначити концентрацію білка за методом Бредфорд.
6. Розрахувати питому активність лактатдегідрогенази 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;

$\epsilon$  – коефіцієнт молярної екстинції НАДН+H<sup>+</sup>;

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

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

За одну одиницю активності ЛДГ приймають таку кількість ферменту, яка розщеплює 1 мкмоль НАДН+H<sup>+</sup> за 1 хвилину в 1 мг білка.

## ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №4 ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

### I. Визначення інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів

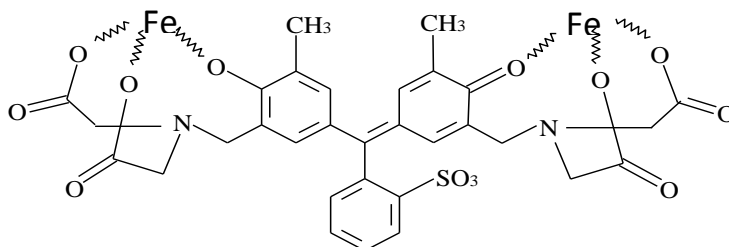
В результаті окислення ненасичених жирних кислот активними формами кисню (АФК) утворюються ліпідні радикали та ініціюється ланцюговий процес пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Основними наслідками ПОЛ є порушення гідрофобності та проникності ліпідного бішару, а також вторинні пошкодження мембранних білків. Кінцевими продуктами ПОЛ є ціла низка сполук серед яких спирти, кетони, альдегіди та альфа-дикарбонільні сполуки ( $\alpha$ -ДК). Деякі з них, наприклад 4-гідрокси-2-ноненаль і малоновий диальдегід (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 маленового диальдегіду. Для безпосереднього визначення вмісту пероксидів ліпідів використовують метод, який ґрунтується на окисненні органічними гідропероксидами іонів  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$  у кислому середовищі.

#### *Принцип методу*

Метод визначення вмісту пероксидів ліпідів з ксиленолом оранжевим ґрунтується на тому, що іони  $\text{Fe}^{2+}$  окислюються пероксидами ліпідів до іонів  $\text{Fe}^{3+}$ .



Іони  $\text{Fe}^{3+}$  утворюють комплекс з ксиленолом оранжевим, який поглинає світло з максимумом в області 580 нм при низьких значеннях рН:



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%-ий етанол;
- 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;
- Свіжоприготовані розчини:
- 4 мМ ксилену оранжевого;
- 1 мМ  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- 1 мМ гідропероксиду кумену.

#### *Хід роботи*

1. А) Попередньо зважених і заморожених мух гомогенізувати в охолоджену 96%-ому етанолі у співвідношенні 1:20 (мг мух:мкл спирту);
- Б) Вирощені клітини дріжджів осадити, промити 50 мМ КФБ (рН 7,0), ресуспендувати в охолоджену 96%-ому етанолі у співвідношенні 1:4 (мг:мкл) і

струшувати на вортекс-міксері зі скляними кульками протягом 15 хв (почергово - 1 хв струшування і 1 хв охолодження в льоді);

**В)** Якщо визначають в тканинах риб або мишей, то тканини гомогенізувати в охолодженому 96%-ому етанолі у співвідношенні 1:5 (мг тканини:мкл спирту).

2. Центрифугувати проби в пластикових мікропробірках впродовж 10 хв, 13000 об/хв, 4°C.
3. Супернатант охайно відібрати в чисті мікропробірки і залишити на льоді (4°C).
4. В чисті пробірки послідовно додати:

Компонент	Вихідна концентрація	Кінцева концентрація	Об'єми для визначення пероксидів ліпідів у гомогенатах, отриманих з		
			плодових мушок	дріжджів	риб та мишей
Ксиленол оранжевий	4 мМ	0,1 мМ	37,5 мкл	37,5 мкл	37,5 мкл
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 М	25 мМ	37,5 мкл	37,5 мкл	37,5 мкл
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 мМ	0,25 мМ	380 мкл	380 мкл	380 мкл
супернатант	-	-	40 мкл ♂ 50 мкл ♀	100 мкл	20 мкл
H <sub>2</sub> O	-	-	502,5 мкл×2 ♂ 497,5 мкл×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.

5. Інкубувати 60 хв при кімнатній температурі. Пробірки накрити чистим папером, щоб уникнути потрапляння бруду.
6. Визначити оптичне поглинання проб при довжині хвилі 580 нм. Проби ретельно зливати назад у пробірки, повністю кількісно переносячи їх вміст. Кювету щоразу промивати.
7. До 1,5 мл проби швидко додати 7,5 мкл 1 мМ гідропероксиду кумену для повного окислення Fe<sup>2+</sup> до Fe<sup>3+</sup>. У «бланки» розчин гідропероксиду кумену не додавати!
8. Інкубувати 60 хв при кімнатній температурі. Пробірки накрити чистим папером.
9. Визначити оптичне поглинання проб при λ=580 нм. Кювету щоразу промивати.
10. Вміст пероксидів ліпідів (в еквівалентах гідропероксиду кумену на грам сирової тканини) обчислити за формулою (для тканин тварин і рослин):

$$[\text{Пероксиди ліпідів}] = \frac{D_{\text{кінцева}}}{\Delta D} \times 5 \times \frac{1500}{V_{\text{супернатанту}}} \times 6$$

де:

[Пероксиди ліпідів] – нмоль еквівалентів гідропероксиду кумену на грам сирової маси;

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

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

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

«5» – 5 нмоль/л, кінцева концентрація кумену;

$V_{\text{супернатанту}}$  – об'єм супернатанту в пробі, мкл;

«1500» – об'єм проби, мкл;

«б» – розведення, використане для приготування гомогенатів тканин тваринних об'єктів. Для гомогенатів з плодкових мушок у формулу замість розведення «б» слід підставити розведення – «21», а для дріжджів цей показник становитиме «5».

**NB!** Досліднику слід пам'ятати, що є багато чинників, які суттєво можуть вплинути на отримувані запропонованим методом результати. Нижче наведено найкритичніші моменти:

- Визначення показника залежить від особливостей досліджуваного зразка та способу його отримання. Більшість зразків – екстракти, отримані після відокремлення білків від ліпідів за допомогою різних розчинників (зокрема, органічних). Коректний підбір відповідного розчинника та його хімічна чистота для екстракції пероксидів ліпідів є важливим у кожному окремому випадку;
- Щоразу переконайтеся, що працюєте в лінійному діапазоні змін показника в залежності від кількості гомогенату/екстракту (детальніше див. у розділі 3 «Визначення активності антиоксидантних ферментів»);
- Іони  $Fe^{2+}$  в присутності кисню у розчинах з рН біля 7 (у деяких випадках навіть у кислому середовищі) дуже швидко окислюються до стабільнішої форми  $Fe^{3+}$ . Отже, розчини Fe (II) необхідно готувати безпосередньо перед визначенням;
- Дотримуйтесь запропонованих вище концентрацій реагентів ( $FeSO_4$  і ксиленолу оранжевого), оскільки їх зміна може призводити до утворення різноманітних комплексів, відмінних від наведеного вище, з відмінними оптичними властивостями;
- Забруднення реакційної суміші іонами металів, особливо заліза, слід уникати, застосовуючи реагенти високої хімічної чистоти та скляного посуду, попередньо вимитого за допомогою хромової суміші (3 %-вий розчин дихромату калію у концентрованій сульфатній кислоті — застосовують у хімічних лабораторіях для миття скляного посуду) та промитого дистильованою водою;
- Не забувайте накривати пробірки з пробами протягом інкубації!

### **Література**

Lushchak V.I., Semchyshyn H.M., Lushchak O.V. “Classic” methods for measuring of oxidative damage: TBARS, xylenol orange, and protein carbonyls, in textbook: Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, editors: D. Abele, T. Zenteno-Savin, J. Vazquez-Medina, Blackwell Publishing Ltd., 2012, 420-431.

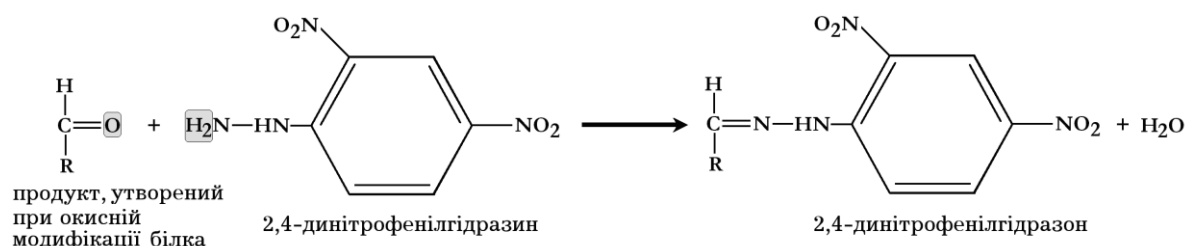
## **II. Визначення вмісту карбонільних груп білків**

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. Досліджувані зразки 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 пластикові мікропробірки: контрольну і дослідну та додати 40% ТХО (для осадження всіх білків) за наступною схемою:

Об'єкт	Дріжджі		Риби/Миші		Мухи		Рослини	
	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%.

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

Об'єкт	Дріжджі		Риби/Миші		Мухи		Рослини	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
V <sub>10мМ</sub>	-	600	-	500	-	400	-	800

ДНФГ, мкл								
V <sub>2M</sub> HCl, 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.

7. Інкубувати проби разом з розчином ДНФГ чи HCl впродовж 1 год для зв'язування барвника з карбонільними групами білків.
8. Центрифувати, 5 хв 7000 об/хв.
9. Супернатанти акуратно злити, стежачи, щоб не втратити білок.
10. Осади двічі промити 1000 мкл суміші E-EA (чи E-BA). Для цього після додавання E-EA білок акуратно зішкребти зі стінок скляними паличками і центрифугувати (10 хв, 7000 об/хв, 21 °C).
11. Щоразу супернатанти акуратно зливати, стежачи, щоб не втратити білок.
12. Осади залити 1,3 мл (2×650 мкл) 6 M розчину гуанідин-HCl, для розчинення білків. Закриті пробірки Eppendorf кілька раз перевернути (для кращого розчинення осадів).
13. Інкубувати 0,5 год для розчинення осадів.
14. Центрифугувати 12-15 хв, 8000 об/хв для відділення нерозчинених часточок.
15. Супернатанти обережно перелити в попередньо підписані пробірки, нерозчинені частки осаду викинути.
16. 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 опалесцієє при додаванні води.
17. У контрольних пробах визначити концентрацію загального білка (за методом Бредфорда).
18. 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<sub>дослід</sub> – оптичне поглинання дослідної проби;

OD<sub>контроль</sub> – оптичне поглинання контрольної проби;

V<sub>пр</sub> – об'єм гуанідинової проби, мл;

$\epsilon$  – коефіцієнт молярної екстинції динітрофенілгідрозонів, 22000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

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

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b>	1
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	2
<b>ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Оцінка антиоксидантного стану у різних груп живих організмів.</b>	3
<b>I. Визначення загальної антиоксидантної активності за знешкодженням катіон-радикалу ABTS<sup>•+</sup></b>	3
<b>II. Визначення вмісту тіолових груп</b>	4
<b>III. Визначення активності антиоксидантних ферментів</b>	7
Визначення активності супероксиддисмутази	8
Визначення активності каталази	11
Визначення вмісту загального білка методом Бредфорда	12
<b>ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Визначення гематологічних показників та активності мієлопероксидази у крові риб та мишей</b>	13
<b>I. Визначення гематологічних показників у крові риб та мишей</b>	13
Визначення вмісту загального гемоглобіну в крові риб та мишей	14
Підрахунок лейкоцитарної формули крові у риб та мишей	14
Підрахунок кількості еритроцитів у крові риб та мишей	16
Підрахунок загальної кількості лейкоцитів у крові риб та мишей	16
<b>II. Визначення активності мієлопероксидази у плазмі крові риб та мишей</b>	17
<b>ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Дослідження метаболічних параметрів у різних груп живих організмів</b>	18
<b>I. Визначення вмісту глюкози і глікогену</b>	18
<b>II. Визначення вмісту лактату у тканинах риб та мишей</b>	20
<b>III. Визначення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази</b>	22
<b>IV. Визначення активності лактатдегідрогенази</b>	23
<b>ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Визначення показників оксидативного стресу</b>	24
<b>I. Визначення інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів</b>	25
<b>II. Визначення вмісту карбонільних груп білків</b>	27
<b>ЗМІСТ</b>	30
<b>ДЛЯ НОТАТОК</b>	31



## ДЛЯ НОТАТОК

## ДЛЯ НОТАТОК