

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Л.І. Остапченко, І.В. Михайлик

БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ: МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ

Навчальний посібник

*Рекомендовано
Міністерством освіти і науки України
як навчальний посібник*



УДК 577.352(075.8)

ББК 28.07я73

О 76

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., акад. НАН України М. Є. Кучеренко,

д-р біол. наук, проф. О. Є. Пахомов,

д-р біол. наук, проф. М. М. Марченко,

*Рекомендовано до друку вченою радою біологічного факультету
(протокол № 13 від 24 червня 2005 року)*

Остапченко Л.І., Михайлик І.В.

О 76 Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій :
Навчальний посібник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський
університет", 2006. – 215 с.

ISBN 966-594-837-7

Описано методи дослідження біологічних мембран, які дозволяють вивчати їхню структуру та функції. У теоретичній частині посібника наведено відомості щодо особливостей будови біомембран (мембранозв'язаних білків і маркерних ферментів), охарактеризовано принципи та напрями застосування методів реконструкції мембранних білків, отримання мембран субклітинних органел, описано принципи роботи з модельними мембранними системами. У практичній частині наведено відповідні методичні процедури дослідження біологічних мембран.

Для студентів біологічних і медичних спеціальностей вищих навчальних закладів, аспірантів і фахівців-біохіміків.

УДК 577.352(075)

ББК 28.07я73

**Гриф надано Міністерством освіти і науки України
Лист № 14/18.2-1787 від 21.07.05**

ISBN 966-594-837-7

© Л.І. Остапченко, І.В. Михайлик, 2006

© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2006

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- АТФ** – аденозинтрифосфат
АТФаза – аденозинтрифосфатаза
АцХР – ацетилхоліновий рецептор
БДГ – β -гідроксибутиратдегідрогеназа
БЛМ – бімолекулярна ліпідна мембрана
в/в – співвідношення вага/вага
в/о – співвідношення вага/об'єм
о/о – співвідношення об'єм/об'єм
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
ВМВ – великі моноламельярні везикули
ВРХБ – високошвидкісна рідинна хроматографія білків
ГЛБ – гідрофільно-ліпофільний баланс
ГМіт – фракція грубих мітохондрій
ДЕАЕ-целюлоза – диетиламіноетил-целюлоза
ДОФХ – диолеїлфосфатидилхолін
ДОХ – дезоксихолат
ДТНБ – динітробензоат
ДТТ – дитіотреїтол
ДФДА – диметилпарафенілдіамін
ЕДТА – етилендіамінтетраацетат
ЕПР – електронний парамагнітний резонанс
ЕР – ендоплазматичний ретикулум
ККМ – критична концентрація міцелоутворення
КМТ – критична міцелярна температура
МКА – моноклональні антитіла
МЛВ – мультиламельярні везикули
ММВ – малі моноламельярні везикули

НДСБ – недетергентні сульфобетаїни
ПААГ – поліакриламідний гель
ПАВ – поверхнево активні речовини
ПЕГ – поліетиленгліколь
ПЛМ – плоска ліпідна мембрана
РЕС – ретикулоендотеліальна система
СР – саркоплазматичний ретикулум
ТЕМЕД – тетраметилендіамін
трис – гідроксиметиламінометан
ТФО – трифтороцтова кислота
ТХО – трихлороцтова кислота
ФЛВ – фосфоліпідні везикули
ФМСФ – фенілметилсульфонілфторид
ЦТАБ – цетилтриметил-1-амоній бромід
ЯМР – адерний магнітний резонанс
ЯО – ядерна оболонка
CHAPS – 3[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulphonate, (3[(3-холамідопропіл)-диметиламоній]-1-пропан-сульфонат
M_r – молекулярна маса
P_n – неорганічний фосфат
SDS – sodium dodecyl sulphate, додецилсульфат натрія

ПЕРЕДМОВА

Біологічні мембрани є структурами, які відіграють ключову роль у функціонуванні клітин живих організмів. Вони обмежують внутрішньоклітинне середовище, тобто забезпечують компартменталізацію, завдяки їм відбувається регуляція життєдіяльності клітин. З біологічними мембранами пов'язаний ціла низка ферментів, що каталізують реакції трансмембранного переносу речовин, беруть участь у процесах передачі сигналу тощо. Дослідження біологічних мембран залишається актуальним питанням, оскільки знання про їхню структуру та функції є необхідними для розв'язання багатьох проблем сучасної біології. Проведення таких досліджень потребує розробки адекватних біохімічних, молекулярно-біологічних, біофізичних, імунологічних та інших методів, які б дозволили з'ясувати не тільки структурно-функціональну організацію біомембран, а й їхню роль у процесах клітинного метаболізму.

Біомембранологія – наука, яка інтенсивно розвивається, і на сьогодні нагромаджено великий масив експериментальних даних щодо її методичної бази. Саме тому вкрай важливою стає систематизація методичних підходів до вивчення мембран. Для проведення науково обґрунтованих експериментів дослідник має володіти теоретичними основами практичних прийомів роботи з біологічними мембранами.

У зв'язку із цим метою даного посібника є огляд основних методів дослідження структури та функцій біологічних мембран, включаючи принципи цих підходів і напрями їх практичного застосування, а також методичні процедури. У теоретичному розділі викладено, по-перше, дані з відповідних літературних джерел стосовно особливостей структури клітинних мембран, які потребують докладного вивчення, описано деякі мембранні ферменти. Як відомо, маркерні ферменти біомембран забезпечують унікальність кожного виду біомембран, використовуються для оцінки чистоти виділених мембранних фракцій і беруть участь у властивих даній мембрані біохімічних процесах.

По-друге, частину огляду присвячено методам очищення мембранних білків за допомогою детергентів, шляхом хроматографії та електрофорезу, а також принципам їх реконструкції із зазначенням можливостей використання реконструйованих мембран. Розроблені на сьогодні процедури солюбілізації дозволяють отримати інтегральні та периферичні білки мембран без втрати ними структури та біологічної активності, вмо-

нтовувати їх у штучно створені везикули. Це дозволило вивчити структуру мембранних білкових ансамблів і з'ясувати принципи роботи багатьох мембранозв'язаних ферментів (системи окисного фосфорилування, сигнального каскаду циклічних нуклеотидів тощо).

По-третє, розглянуто основні шляхи виділення субклітинних структур і мембран різних органел, що є дуже важливим, оскільки для проведення докладного вивчення будь-якої мембрани необхідно насамперед виділити її з високим ступенем чистоти без порушення структурно-функціональної організації.

По-четверте, описано основні принципи роботи з модельними мембранними системами, охарактеризовано різні моделі ліпідних мембран, механізми їх формування та властивості. Особливу увагу зосереджено на ліпосомах, які є найпоширенішою моделлю біологічних мембран, і зокрема, на методах їх отримання, аспектах застосування в наукових дослідженнях, фармакології та медицині.

У практичному розділі наведено основні методичні операції, які дозволяють досліджувати структуру та функції біологічних мембран і принципи яких було описано в теоретичному розділі. Серед них методи виділення клітин з різних органів, руйнування клітинної мембрани, виділення різних субклітинних фракцій (плазматичних мембран, мітохондрій, ядер, апарату Гольджі, мікросом, синапсом), методи оцінки активності маркерних ферментів клітинних органел (Na^+ , K^+ і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз, 5'-нуклеотидази та ін.), шляхи виділення препаратів цих ферментів з різних біологічних тканин, а також методи солюбілізації та реконструкції мембранних білків.

У посібнику значну увагу зосереджено на теоретичних засадах використання методів дослідження біомембран і тому наведено чималий список літератури, включаючи оригінальні роботи щодо розробки та вдосконалення описаних методик – від найперших до найсучасніших вітчизняних та іноземних публікацій.

Дане видання рекомендовано широкому загалу читачів: студентам біологічних і медичних спеціальностей вищих навчальних закладів, а також аспірантам і науковим співробітникам, робота яких пов'язана з дослідженням біологічних мембран. Зусилля авторів цього посібника спрямовано на те, щоб читач глибше зрозумів не тільки шляхи вивчення клітинних мембран та можливості їх практичного застосування, а й особливості структури та функції біомембран взагалі.

РОЗДІЛ 1

ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРИ КЛІТИННИХ МЕМБРАН І МЕТОДИ ЇХ ВИВЧЕННЯ

1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

Біологічні мембрани є найважливішими компонентами клітини, які відокремлюють клітину від зовнішнього середовища, їхня цілісність є необхідною умовою існування клітини як єдиного цілого. Більшість клітин еукаріотів має розвинуту мембранну структуру, яка включає плазматичну (зовнішню) мембрану й більш або менш складний набір внутрішньоклітинних мембран (ендомембран), до яких належать ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, мембрани клітинних органел (ядер, мітохондрій, лізосом, пероксисом та ін.) (рис. 1) [26].



Рис. 1. Будова тваринної клітини

У табл. 1 наведено дані про основні принципи організації біомембран та їхніх функції.

Плазматична мембрана, що має селективну проникність для різних речовин, забезпечує підтримання постійного складу внутрішньоклітинного середовища, а також захищає клітину від впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища.

Ендомембрани поділяють клітину на відсіки (компарменти), в яких здійснюються специфічні функції: синтез біомолекул (ендоплазматичний ретикулум), відтворення генетичної інформації (ядро), генерація енергії (мітохондрії), вивільнення продуктів життєдіяльності (апарат Гольджі) та ін.

Така компарменталізація є необхідною для забезпечення автономії та контролю за здійсненням диференційованих функцій клітини [23]. Крім бар'єрної функції, біологічні мембрани забезпечують зв'язок між окремими внутрішньоклітинними компартментами, а також між клітиною й навколишнім середовищем. У біомембранах локалізовані кілька спеціалізованих транспортних систем, наприклад, іонні канали та рухливі переносники, що дифундують з однієї поверхні мембрани до іншої.

Мембрани також виконують низку спеціалізованих функцій, таких як ендо- та екзоцитоз, міжклітинні взаємодії, проліферація тощо [20].

Біологічні мембрани мають складну гетерогенну структурну організацію, яку зумовлено, по-перше, різноманіттям їх компонентів і, по-друге, утворенням комплексів між ними. Основними структурними компонентами біомембран є білки та ліпіди. Фосфоліпіди переважно організовані у плоский бішар (ліпідний матрикс), у який занурені численні білки, які утворюють мозаїчну структуру (рис. 2).

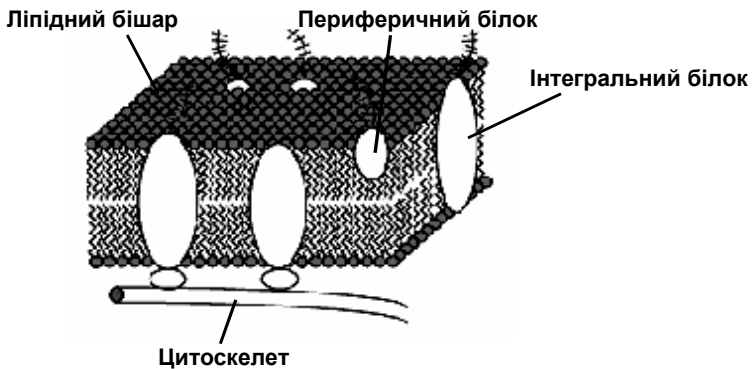


Рис. 2. Рідинно-мозаїчна модель структури біологічної мембрани

Таблиця 1. Назва, величини та функції біомембран (на прикладі клітини печінки) [20]

Назва	Діаметр ¹ , мкм	Кількість у клітині	Частка об'єму клітини, %	Фізіологічні функції
Ядро (ядерна мембрана)	8	1	6	Зберігання генетичної інформації
Мітохондрії (зовнішня й внутрішня мембрани)	1–2	1665	16	Накопичення енергії, метаболічні перетворення, дихання
Лізосоми	0,5–1	250	2	Лізис (гідроліз) речовин
Пероксисоми	0,5–1	370	2	Утворення й перетворення пероксиду водню, метаболізм нуклеїнових кислот
Гранулярний ендоплазматичний ретикулум	(0,05–0,3)	-	10	Біосинтез білків
Гладкий ендоплазматичний ретикулум	(0,02–0,3)	-	6	Синтез ліпідів, транспорт іонів
Апарат Гольджі	(0,08–3)	Кілька	1	Утворення проферментів, полісахаридів, ліпопротеїнів, слизу
Фагосоми	0,5–2	?	Кілька	Захоплення (поглинання) частинок діаметром більше 1 мкм
Піносоми	0,3–0,8	?	Кілька	Поглинання речовин більше 1 мкм
Облямовані везикули	0,05–0,1	Багато	Кілька	Транспорт речовин у клітину та з клітини
Полісоми	0,5	?	0,1	Біосинтез білків
Цитоплазматична мембрана	-	1	-	Бар'єр, транспорт речовин, метаболізм, рецепція
Клітинна оболонка (глікокалікс)	-	1	-	Захист, контакти

¹ – Діаметр всієї клітини дорівнює 20 мкм.

Білки біомембран. Різноманіття функцій, які виконуються біологічними мембранами, в більшості випадків зумовлено білками, що містяться в їхній структурі [20]. В основу класифікації мембранних білків покладено міцність їх зв'язування та положення в біомембранах, відповідно до чого їх поділяють на два класи: *інтегральні* (внутрішні) та *периферичні* (поверхневі) [34]. Інтегральні білки, як правило, мають великі гідрофобні ділянки, розташовані всередині мембрани. Такі білки можна виділити з мембрани тільки шляхом її руйнування за допомогою екстракції детергентами. На відміну від інтегральних, периферичні білки легко відокремлюються від мембран за дії сольових розчинів, зміни рН тощо [26]. При цьому в молекулах периферичних білків залишки гідрофільних амінокислот займають положення на поверхні білкової глобули. Міцність зв'язування білків з ліпідним бішаром варіює в широких межах – "від простої сорбції до структур типу каналу" [23].

На початку розвитку мембранології припускали, що мембранні білки за своєю структурою є досить гомогенні й упаковані у вигляді β -шарів на поверхні бішару. Сьогодні дослідники швидше схильні вважати, що принаймні у трансмембранних білків їхні занурені в мембрану ділянки містять α -спиралі. Водночас передбачається, що інтегральні мембранні білки можуть виявитися набагато складнішими, ніж ми зараз уявляємо.

Гранична кількість гідрофобних амінокислотних радикалів для глобулярного білка не повинна перевищувати 40 %. Навіть за такого обмеження ці молекули можуть бути стабілізованими лише у вигляді громіздких октамерів – ансамблів, що містять вісім субодиниць [12]. Проте деякі білки мають значно більше гідрофобних амінокислот у своєму складі. Ці білки можуть стабільно функціонувати лише тоді, коли вони занурені в гідрофобні мембранні структури клітини. Тому такі білки називаються *мембранними* або *мембранозв'язаними*. Мембранні білки переважно утворюють надмолекулярні ансамблі, хоча всередині мембранного бішару в цьому немає структурної необхідності, оскільки гідрофобні білки цілком занурені всередину мембранного бішару й легко переміщуються в латеральному напрямку. У зв'язку із цим перед дослідниками постало питання про біологічне значення олігомерних ансамблів, утворених мембранними білками. Такі ансамблі можуть складатися з деяких однакових молекул (гомоолігомери) або містити різні за структурою та функцією білки (гетероолігомери).

Білки можуть прикріплюватися до мембрани кількома способами, що схематично зображено на рис. 3:

1. *Зв'язування з білками, зануреними в бішар.* Як приклади можна навести F_1 -частину H^+ -АТФази, що зв'язується із зануреною в мембрану F_0 -частиною, а також деякі білки цитоскелета.

2. *Зв'язування з поверхнею бішару.* Ця взаємодія має в першу чергу електростатичну природу (наприклад, основний білок мієліну) чи гідрофобну (наприклад, поверхнево-активні пептиди й, можливо, фосфоліпази). На поверхні деяких мембранних білків існують гідрофобні домени, що

утворюються завдяки особливостям вторинної чи третинної структури. Зазначені поверхневі взаємодії можуть використовуватися як доповнення до інших взаємодій, наприклад, до трансмембранного заякорювання.

3. *Зв'язування за допомогою гідрофобного "якоря"*; ця структура зазвичай виявляється як послідовність неполярних амінокислотних залишків (наприклад, у цитохрому b_5). Деякі мембранні білки використовують як якор ковалентно зв'язані з ними жирні чи кислоти фосфоліпиди.

4. *Трансмембранні білки*. Одні з них перетинають мембрану тільки один раз (наприклад, глікофорин), інші – кілька разів (наприклад, лактозопермеаза, бактеріородопсин).

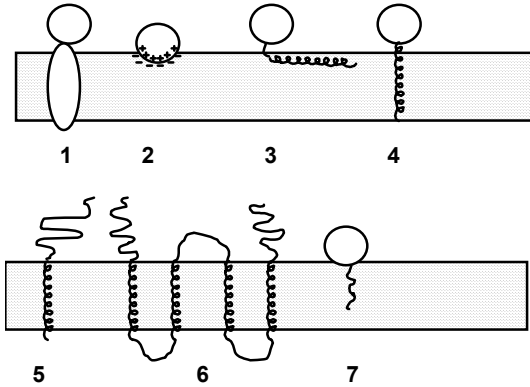


Рис. 3. Різні способи прикріплення мембранних білків до мембрани. Пептидний якор може розміщуватися або на N-, або на С-кінці молекули. N- і С-кінці трансмембранних білків можуть перебувати як на зовнішній, так і на внутрішній поверхні мембрани [18]:

- 1 – зв'язування з іншими "якірними" білками (сукцинатдегідрогеназа);
- 2 – електростатичне зв'язування з бішаром (мієліновий основний білок);
- 3 – гідрофобне зв'язування, але практично без занурення в бішар (піруватоксидаза *E. coli*);
- 4 – заякорювання за допомогою короткого сегмента (цитохром b_5);
- 5 – поодинокий трансмембранний сегмент (глікофорин);
- 6 – множинні трансмембранні сегменти (лактозопермеаза);
- 7 – заякорювання за допомогою ковалентно зв'язаного ліпиду (лужна фосфатаза еукаріотів)

Відмінності між зовнішніми (периферичними) і внутрішніми (інтегральними) мембранними білками не задають однозначно спосіб їх прикріплення до бішару; ці відмінності визначають лише відносну силу такого зв'язування.

Особливу зацікавленість дослідників викликають інтегральні білки мембран, оскільки вони виконують важливі функції в метаболізмі клітини, зокрема іонні насоси, натрієві канали та аденілатциклаза. Ступінь занурення цих білків у ліпідний матрикс визначається, як правило, їхньою амінокислотною послідовністю й тривимірною структурою [26]. Наприклад, деякі інтегральні білки (аденілатциклаза, Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -

АТФаза, натрієвий канал) пронизують ліпідний бішар, утворюючи специфічні домени як на зовнішній, так і на внутрішній поверхні мембрани.

Певні інтегральні білки (наприклад, Na^+ , K^+ -АТФаза, цитохромоксидаза та ін.) здатні утворювати олігомерні комплекси, взаємодіючи один з одним та з іншими білками [20]. Вважають, що ступінь олігомеризації мембранних білків є важливою для реалізації їхньої функціональної активності за різних функціональних станів клітини. Крім цього, показано, що деякі інтегральні мембранні білки взаємодіють з периферичними білками біомембран, які є локалізованими як на зовнішньому, так і на внутрішній поверхні мембрани. У результаті цих білок-білкових взаємодій у біомембранах реалізуються регуляторні механізми, що модулюють біологічну активність мембранних білків (наприклад, ферментів).

Протягом останніх десятиріч особливої інтенсивності набуло вивчення інтегральних білків біомембран на молекулярному рівні, що зумовлено успіхами в розробці методів виділення, очищення та реконструкції цих білків. Так, із застосуванням моноклональних антитіл, детергентних підходів було проаналізовано структуру, внутрішньомембранну організацію та механізми функціонування цілої низки "ключових" мембранних білків, зокрема глікофорину, цитохрому b_5 , родопсину, адегілатциклази [23]. Разом із цим залишаються нез'ясованими чимало важливих питань, що стосуються внутрішньомембранної локалізації, орієнтації, третинної та четвертинної структури мембранних білків, а також молекулярні механізми регуляції їх функціонування. Наприклад, досі неможливо дати однозначну відповідь на запитання, скільки білків входить до складу тієї чи іншої мембрани [24]. І основна причина цього полягає в тому, що отримання багатьох мембранних білків без порушення їхньої структури та функції є утрудненим. Для виділення мембранозв'язаних білків (наприклад, Na^+ , K^+ -АТФази та аденілатциклази) ефективним є використання детергентів (ПАВ), проте деякі обставини перешкоджають цьому [23].

Застосування детергентної техніки, електронно-мікроскопічних досліджень, рентгеноструктурного аналізу дозволило досягти значних успіхів у вивченні структурної організації багатьох мембранних білків у солюбілізованому та мембранозв'язаному станах, а також оцінити специфіку їх внутрішньомембранної локалізації. Існують дані про внутрішньомембранну організацію деяких векторних ферментів біомембран, таких як аденілатциклаза, H^+ -АТФаза внутрішньої мембрани мітохондрій, Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза та ін. [35].

Проте для багатьох мембранних білків досі невідомою є конформація внутрішньомембранного сегмента їхньої молекули. Потребує вирішення питання про специфіку залежності функціональної активності білків, що "пронизують" мембрану (аденілатциклаза, натрієвий канал, іонні насоси) від фазового складу ліпідів у бішарі. За допомогою високочутливих методів (ЯМР, ЕПР, флуоресцентних зондів) вдалося довести, що інтегральні білки, незалежно їхніх специфічних функцій, однаково впливають на структуру біомембран.

Зміни фазового стану мембранних ліпідів сьогодні розглядаються як один з механізмів регуляції векторних ферментів біомембран, в тому числі й іонних насосів [23]. Важливим регуляторним фактором багатьох інтегральних білків є їхня олігомерна структура. До таких білків належать H^+ -АТФаза внутрішньої мембрани мітохондрій, Na^+, K^+ -АТФаза плазматичних мембран, H^+, K^+ -АТФаза слизової кишечнику та ін. Усі білки, що містять більш ніж одну субодиницю, є алостеричними, тобто їх функціональна активність регулюється при зміні конформації субодиниці в результаті зв'язування із фізіологічним лігандом (наприклад, іонами, АТФ тощо). Сьогодні точна олігомерна структура багатьох функціонально важливих білків залишається нез'ясованою, що утруднює розшифрування молекулярних механізмів їх функціонування [34].

Наочне уявлення про різноманіття функцій мембранних білків, більшість яких визначають функціональну активність мембран, дає класифікація, запропонована Я. Кагавою (табл. 2).

Таблиця 2. Класифікація білків біомембран залежно від їхніх функцій [20]

Функції	Мембранні білки
1. Каталізатори метаболізму	Ферменти: оксидоредуктази, трансферази, ізомерази, лігази, ліази. Інші: переносники електронів (цитохроми, білки з негемовим залізом та ін.)
2. Транспорт	Переносники: рухливі переносники. Канали, нерухливі мембранні пори й селективні фільтри. Ворота: специфічна ворітна система. Насоси: механізм активного транспорту
3. Рухливість	Мікротрубочки. Мікрофіламенти. Війки, білок динеїн, мікрроворсинки
4. Рецепція й передача інформації	Хеморецептори: рецептори гормонів та ін. Рецептори світла: родопсин. Антитіла та інші речовини, пов'язані з імунітетом
5. Збереження структури	Волокнисті білки: колаген та ін. Інші: глікокалікс

Таким чином, біомембрана являє собою складний надмолекулярний комплекс білків і полярних ліпідів, що має гетерогенну структурну організацію, яку зумовлено різноманіттям складових компонентів мембрани та утворенням комплексів між ними. Хоч досі залишається не виявленою точна молекулярна структура біомембран, існуючі на сьогодні уявлення про її архітекtonіку та динаміку дозволяють досліджувати роль окремих мембранних компонентів у реалізації процесів клітинного метаболізму. До таких компонентів належать векторні ферменти біомембран, які виконують ключову роль у здійсненні важливих трансмембранних процесів.

2. МЕМБРАННА ЕНЗИМОЛОГІЯ

2.1. ТИПИ МЕМБРАННИХ ФЕРМЕНТІВ

Загально визнано, що біологічна мембрана є динамічною (у фізично-му розумінні), тобто це не просто пасивна структура, що оточує водні компартменти клітини. Зокрема, мембранозв'язані ферменти є надзвичайно різноманітними. Їх розподіляють на такі групи [18]:

1. *Трансмембранні ферменти, що каталізують спряжені реакції на протилежних поверхнях мембрани.* Типові ферменти цього класу мають кілька активних центрів. Характерними прикладами є окисно-відновні ферменти, наприклад, фотосинтетичні реакційні центри рослин і бактерій або цитохром с-оксидаза мітохондрій. Розміщені на протилежних поверхнях мембрани активні центри цих ферментів спряжені один з одним за допомогою потоку електронів, який генерує трансмембранний електричний потенціал. До цього класу ферментів належить велика кількість рецепторів. Зв'язування ліганду (наприклад, гормону) з доменом, який локалізований із зовнішньої поверхні клітинної мембрани, приводить до змін у цитоплазматичному домені ферменту, який, у свою чергу, ініціює клітинну відповідь. У цьому випадку через мембрану переноситься інформація, а не заряди або певні розчинені молекули. Деякі рецептори є тирозиновими протеїнкіназами і тим самим являють собою мембранні ферменти з властивою їм каталітичною активністю. Більшість же мембранних рецепторів самі по собі не каталізують ніяких хімічних реакцій і не є в цьому розумінні ферментами.

2. *Трансмембранні ферменти, які беруть участь у транспорті речовин.* Багато мембранних білків беруть участь у транспорті молекул через бішар. Активний транспорт може бути спряжений з гідролізом АТФ, як у випадку Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулула. Рушійною силою активного транспорту можуть бути іонні градієнти. Наприклад, транспорт лактози через плазматичну мембрану *E. coli* за допомогою лактозопермеази спряжений з поглинанням протонів і залежить від трансмембранного градієнта електрохімічного потенціалу.

3. *Білки, які є компонентами електронно-транспортних ланцюгів.* Найбільш типові ферменти цього класу – компоненти дихального ланцюга мітохондрій, який завершується цитохром с-оксидазою; ферменти системи електронного транспорту мікросом, які включають цитохром P_{450} і цитохром b_5 ; елементи фотосинтетичного електронно-транспортного ланцюга в тилакоїдах. Локалізація компонентів електронно-транспортних ланцюгів у мембрані приводить до збільшення їх локальної концентрації, що, у свою чергу, дозволяє значно прискорити перенесення електронів між молекулами. Головне питання полягає в тому, чи є компоненти відповідних електронно-транспортних ланцюгів білками, які вільно дифун-

дують у площинні мембрани або вони присутні в мембрані у вигляді більш-менш триваложивучих суперкомплексів [18].

4. *Ферменти, що використовують мембранозв'язані субстрати.* До цього класу належать ферменти, які беруть участь у метаболізмі компонентів мембрани: фосфоліпідів, гліколіпідів, поліізопреноїдних сполук і стероїдів, а також ферменти, залучені до процесингу мембранних і секреторних білків. У більшості ці ферменти є інтегральними мембранними білками, але іноді (прикладом є фосфоліпаза) являють собою розчинні білки, які лише тимчасово зв'язані з мембраною. Прикладом білків цього типу є лідерна пептидаза з *E. coli* та фосфоліпаза С, які зв'язані з мембраною через глікозилфосфатидилінозитольний якір.

5. *Ферменти, які використовують водорозчинні субстрати.* Більшість мембранозв'язаних ферментів використовують розчинні субстрати. У деяких випадках фермент локалізується в тій частині (ділянці) мембрани, де концентрація субстрату є високою. Наприклад, ацетилхолінестераза, яка каталізує гідроліз ацетилхоліну, ймовірно, фіксується в постсинаптичній мембрані за допомогою ковалентної зшивки із фосфатидилінозитольним гліколіпідом. Багато ферментів, які беруть участь у гідролізі крохмалю та білків, прикріплюються до мембран мікроворсинок кишечника за допомогою гідрофобних доменів, які розташовані в N-кінці поліпептидів. Можливо, зв'язок цих ферментів травлення з мембраною дозволяє створити високу концентрацію молекул, що сприяє їх ефективному поглинанню клітиною. Як приклад можна навести два ферменти із цієї групи: сахароза – ізомальтоза, мальтоза – глюкоамілаза.

6. *Ферменти, що здійснюють човникові переміщення між цитозолем і мембраною, активність яких модулюється зв'язуванням з мембраною.* Цю групу мембранних ферментів відкрили недавно. Вони здатні зв'язуватись з поверхнею фосфоліпідного бішару або із специфічними білковими рецепторами. Цілком імовірно, що ці ферменти активуються під час зв'язування з мембраною, але іноді спостерігається і їх інактивація. Типовими представниками ферментів, які активуються у процесі зв'язування, є піруватоксидаза *E. coli*, протеїнканаза С та деякі ферменти, що беруть участь у каскаді процесів згортання крові.

Важливим моментом, який слід брати до уваги під час роботи з мембранними ферментами, є роль ліпідного оточення мембранних ферментів у вияві їх активності [18]. Цей фактор може дуже ускладнити інтерпретацію кінетичних даних і вимагає значних експериментальних зусиль у реконструкції очищених інтегральних мембранних ферментів із фосфоліпідами для того, щоб наблизити умови роботи до умов *in vivo* або принаймні створити для ферменту відповідне оточення.

2.2. ОСОБЛИВОСТІ АКТИВНОСТІ МЕМБРАННИХ ФЕРМЕНТІВ

Регуляція активності мембранних ферментів здійснюється за різноманітними механізмами, зокрема, за рахунок зміни концентрації їх субстратів, за алостеричним механізмом (для ферментів, що об'єднані в метаболічні ланцюги), у результаті хімічної модифікації молекули ферменту, фосфорилування під дією протеїнкіназ, шляхом підвищення експресії даного ферменту у клітині та синтезу його ізоферментних форм (наприклад, Na^+ , K^+ -АТФаза) [12].

Проблема вивчення функціонування мембранних ферментів зводиться, власне, до проблеми гетерогенного каталізу. Ці ферменти перебувають не в однорідному гомогенному середовищі, а локалізовані в біомембрані, міцелі, везикулі та іншій мембранній системі. Мембранні ферменти надто чутливі до локального оточення, яке взагалі може суттєво відрізнятися від оточення в розчині. Більше того, для здійснення каталітичної реакції фермент і мембранозв'язаний субстрат мають перебувати в одній і тій самій мембрані або везикулі, тому під час аналізу кінетичних властивостей мембранних ферментів часто виникають проблеми, пов'язані з їх просторовим розподілом [18]. Розглянемо деякі положення щодо кінетичних аспектів функціонування мембранних ферментів:

1. *Просторовий розподіл ферменту й субстрату.* Фермент і субстрат повинні мати можливість взаємодіяти. Припустимо, що ми вивчаємо очищений мембранний фермент у розчині детергента з неполярним ліпофільним субстратом (наприклад, убіхінон, цитохром с-оксидоредуктаза). Як фермент, так і субстрат сольобілізовані в детергентних міцелах, але для того, щоб міг здійснюватись каталіз, вони мають перебувати в одних і тих самих міцелах. За надлишку детергента збільшується ймовірність того, що фермент і субстрат міститимуться в різних міцелах і лімітуючою стадією в даному випадку стане дифузія субстрату у ферментно-детергентні міцели. При цьому швидкість реакції ферменту залежить від поверхневої концентрації субстрату в міцелі, а не від об'ємної. Під час роботи із сильно гідрофобними субстратами часто виникає інша проблема. Такі субстрати можуть не до кінця сольобілізуватися в міцелах або мембранних везикулах, частина з них коагулює з утворенням грудочок (клубочків) або мікроскопічних кристалів, в які фермент не може проникнути. Невелика кількість ферментів можуть працювати у повернутих назовні міцелах, коли структури, що містять воду, дисперговані в органічному розчиннику, але це швидше є винятком, ніж правилом.

Інші проблеми виникають при визначенні активності мембранних ферментів, коли або фермент, або субстрат перебувають як у мембранозв'язаній, так і в розчинній формах. Як приклад можна навести "поверхневі" ферменти – ліпази або фактори згортання крові. При аналізі таких систем необхідно знати співвідношення між формами ферменту в даних експеримента-

льних умовах і каталітичну активність кожної з них. У всіх цих випадках значення величин максимальної швидкості й констант Міхаеліса може бути зовсім іншим, ніж для ферментів, активність яких вимірюється в гомогенному середовищі, що дуже ускладнює інтерпретацію цих параметрів.

2. *Гістерезис і гетерогенність.* Мембранним ферментам притаманні й інші особливості, які ускладнюють інтерпретацію кінетичних даних. Ці особливості пов'язані із солюбілізацією. Каталітична активність мембранних ферментів часто великою мірою залежить від детергента або використаного фосфоліпиду. Зазвичай, активність мембранних ферментів вимірюють у суміші, яка містить детергент і екзогенно доданий фосфоліпід. Крім цього, очищений ферментний препарат часто містить ендогенні ліпіди. За таких умов фізичний стан ферменту, зокрема ступінь його агрегації, виявляється надто невизначеним і швидше за все гетерогенним. Нерідко в одному й тому самому середовищі, компоненти якого змішувалися в різній послідовності, отримують зовсім різні ферментативні активності. Така залежність від походження препарату є прикладом гістерезису і досить типова для мембранних ферментів. По суті, фермент "застрягає" в метастабільному стані й не може набути більш стабільної "робочої конформації" [18]. Наприклад, звичайне змішування солюбілізованого мембранного білка із фосфоліпідними везикулами, мабуть, не забезпечить вбудовування білка в ліпосоми. Для досягнення успішної реконструкції існують спеціальні процедури, які дозволяють уникнути переходу системи в небажаний метастабільний стан. Прикладом ферменту, що утворює великі агрегати, є бактопренолкіназа, сильно гідрофобний білок із *Staphylococcus aureus*. Її активність не залежить від ступеня агрегації, що зустрічається далеко не завжди.

Явище гістерезису великою мірою залежить від типу фосфоліпиду, тому дані про специфічність ліпідів щодо активності окремих мембранних ферментів часто виявляються сумнівними.

3. *Ферменти у везикулах.* Часто в дослідженнях використовують мембранні ферменти, вбудовані в бішар замкнених везикул. Це можуть бути або ферменти *in situ*, які містяться в ізольованих природних мембранах, або очищені ферменти, вбудовані в ліпосоми. Під час таких експериментів виникають свої проблеми. Найбільш явна з них пов'язана з тим, що активний центр ферменту може перебувати усередині везикули й, отже, бути ізольованим від розчинного у воді субстрату. Із цим пов'язана проблема так званої прихованої ферментативної активності, яка виявляється після того, як везикули з тих або інших причин стануть проникними або зруйнуються. Це явище часто використовують для визначення орієнтації мембранного ферменту у везикулі. Частина прихованої активності прямо відповідає частці ферменту, активний центр якого локалізований усередині везикули. При цьому можна використовувати тільки такі субстрати, які не здатні проникати через мембрану (наприклад, цитохром с у випадку цитохром с-оксидази). Проблеми іншого пла-

ну виникають під час визначення активності трансмембранних ферментів, що каталізують реакції, які супроводжуються транспортом речовин або зарядів через бішар. Прикладом таких ферментів можуть бути цитохром с-оксидаза, яка каталізує перенесення електронів через мембрану й транспорт протонів у протилежному напрямку, а також різноманітні АТФ-залежні іонні насоси, наприклад, Ca^{2+} -АТФаза. Під час вбудовування у везикулу переважно однієї орієнтації відносно внутрішньої й зовнішньої поверхонь мембрани везикули такі ферменти створюють трансмембранний градієнт концентрації речовин або електричний потенціал. Саме із цього й складається їхня фізіологічна функція. У везикулах з маленьким внутрішнім об'ємом, проте, цей градієнт утворюватиметься дуже швидко, що приведе до фактичного зменшення кількості обертів ферменту, якщо не буде застосовано відповідних заходів. Це пов'язано з тим, що хімічна робота, яка здійснюється під час перенесення молекули, іона або електрона проти існуючого градієнта, збільшується з підвищенням цього градієнта. Якщо градієнт вище певного рівня, фермент взагалі припиняє працювати. Система, в якій відбувається таке зниження активності, називається "спряженою", а сама ця активність є мірою того, наскільки цілісними є везикули та якою мірою запобігається витік іонів або молекул у напрямі градієнта, створеного за допомогою ферменту [18]. Ступінь спряження можна оцінити, вимірюючи активність ферменту в умовах, коли градієнту надають можливість утворитися. Наприклад, градієнт електронного потенціалу, який формується на мембрані везикули цитохром с-оксидазою, можна зруйнувати, якщо додати в середовище іонофор, який збільшує іонну (K^+ або H^+) проникність бішару. При цьому необхідно, щоб усередині везикули була висока концентрація буфера, інакше утилізація протонів усередині везикули з утворенням води приведе до швидкого та сильного залуження внутрішнього середовища, що може вплинути на ферментативну активність.

Робота деяких іонних каналів і ферментів безпосередньо регулюється трансмембранним потенціалом. За допомогою флуоресцентних і спінових міток встановлено, що за наявності різниці потенціалів може суттєво збільшуватись мікрів'язкість бішару. Це також відбивається на активності ферментів. Можна стверджувати, що трансмембранний потенціал впливає на ступінь агрегації деяких мембранних білків, але фізіологічна роль цього явища невідома. Усі ці ефекти спостерігаються тільки на замкнених везикулах.

4. Вплив поверхневого потенціалу. Більшість біомембран містить значну кількість негативно заряджених фосфоліпідів, отже, вони несуть сумарний негативний заряд. Із цим негативним зарядом, розподіленим по верхній мембрані, пов'язаний поверхневий електричний потенціал. Він викликає зменшення концентрації негативно заряджених іонів у прилеглих до мембрани шарах порівняно із середньою об'ємною концентрацією та збільшення локальної концентрації позитивно заряджених іонів поблизу

поверхні мембрани. Поверхневий потенціал, змінюючи локальну концентрацію заряджених субстратів і протонів, може досить суттєво вплинути на поведінку ферментів, активний центр яких локалізований біля поверхні мембрани. За фізіологічної іонної сили цей ефект виявлятиметься, головним чином, у ділянці, яка безпосередньо прилягає до зарядженої поверхні мембрани, проте може стати й досить суттєвим. Вплив поверхневого потенціалу визначається у зміні величини константи Міхаеліса (K_M) для заряджених субстратів або у зсуві рН-залежної активності ферменту, тому що локальна концентрація будь-якої зарядженої речовини буде або вищою, або нижчою, ніж концентрація в об'ємі. У зв'язку із цим кінетичні характеристики мембранного ферменту, вбудованого у везикули, які одержані з різних фосфоліпідів і мають різну поверхневу густину заряду, можуть відрізнятися, у свою чергу, від властивостей ферменту, який міститься в нейтральних детергентних міцелах [18].

Схожі ефекти спостерігались у деяких мітохондріальних і мікосомальних ферментів як *in situ*, так і вбудованих у фосфоліпідні везикули, наприклад, для арилсульфатази, яка використовує негативно заряджений субстрат, або для моноамінооксидази, що каталізує перетворення катіонного субстрату. Зміни ліпідного оточення β -гідроксибутиратдегідрогенази також впливають на величини K_M для NADH. Вважають, що цей вплив зумовлено змінами густини поверхневого заряду.

На закінчення слід зазначити, що в літературі активно обговорювалась роль поверхневого заряду тилакоїдних мембран як фактора, що регулює латеральний розподіл мембранних білків і взаємодію між мембранами. Проте в цьому випадку поверхневий заряд мембрани визначається, головним чином, білковими компонентами, а не ліпідами. Разом із цим, зрозуміло, що облік поверхневого потенціалу абсолютно необхідний під час аналізу роботи багатьох мембранних ферментів *in vivo*, а також при реконструюванні систем з очищених компонентів, які модулюють природні структури.

Таким чином, вивчення особливостей будови та активності мембранних ферментів є актуальним з огляду на необхідність з'ясування молекулярних механізмів функціонування біологічних мембран.

2.3. МАРКЕРНІ ФЕРМЕНТИ БІОМЕМБРАН

Відомо, що кожна органела або сітка мембран має такі компоненти, що забезпечують її унікальність. Для кожної біомембрани з урахуванням її функціональної "спеціалізації" є характерним той чи інший спектр мембранних або *маркерних ферментів*. До них належать порівняно стабільні ферменти, активність яких є достатньо високою й може бути легко виміряна. Такі ферменти називаються маркерними або векторними й використовуються для оцінки чистоти виділених мембранних фракцій. Вони є специфічними для певного виду мембран і беруть участь у біохі-

мічних процесах, властивих даним мембранам. Ферменти-маркери локалізовані переважно в конкретних клітинних органелах, і тому їх може бути виявлено в тих мембранах, з якими вони були асоційовані. Прикладами маркерних ферментів є аденілатциклаза, 5'-нуклеотидаза, Na^+ , K^+ -АТФаза та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза (маркери плазматичних мембран), Ca^{2+} -АТФаза (маркер саркоплазматичного ретикулума), H^+ -АТФаза, цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа, НАДН-дегідрогеназа (внутрішній маркер мітохондріальної мембрани) [23]. У табл. 3 наведено дані про субклітинну локалізацію стандартних маркерних ферментів.

Таблиця 3. Ферменти – маркери субклітинних фракцій [20]

Фракція		Маркерний фермент	Номер за КФ
Плазматична мембрана	Базолатеральна	Аденілатциклаза	4.6.1
	Апікальна	Na^+ , K^+ -АТФаза 5'-Нуклеотидаза Лейцинамінопептидаза- Глутамілтрансспептидаза	3.6.1.37 3.1.3.5 3.4.11.1 2.3.2.12
Ендоплазматичний ретикулум		Глюкозо-6-фосфатаза NADPH-цитохром с-редуктаза Ca^{2+} -АТФаза	3.1.3.9 1.6.2.4
Апарат Гольджі	Трансділянка й середня ділянка	Галактозилтрансфераза Сіалілтрансфераза NADPH-фосфатаза	2.4.1.38 2.4.99.1 3.6.1.22
Мітохондрії	Внутрішня мембрана	Сукцинатдегідрогеназа Цитохромоксидаза Ротеноннечутлива NADPH-цитохром с-редуктаза	1.3.99.1 1.9.3.1 1.6.99.1
	Зовнішня мембрана	Моноаміноксидаза Кінуреїн-3-гідроксилаза	1.4.3.4 1.14.13.9
Лізосоми		Кисла фосфатаза β -Глюкуронідаза Арилсульфатаза	3.1.3.2 3.2.1.31 3.1.6.1
Пероксисоми		Каталаза Карнітинпальмітолтрансфераза	1.11.1.6 2.3.1.21
Цитозоль		Лактатдегідрогеназа	1.1.1.22

Мембранозв'язані ферменти каталізують реакції, які протікають на одній поверхні мембрани, тобто приєднують субстрат на одній, а виділяють продукт – на іншій, надаючи ферментній організації векторний характер. Наприклад, фермент аденілатциклаза може зв'язувати і розщеплювати субстрат АТФ тільки всередині клітини, Na^+ , K^+ -АТФаза активується внутрішньоклітинними іонами натрію та зовнішньоклітинними іонами калію, а розщеплює АТФ всередині клітини [96]. Тому для здійснення своїх трансмембранних

функцій векторні ферменти мають прошаровувати всю товщу мембрани (тобто вони є типовими інтегральними білками).

Виділяють такі критерії відбору маркерних ферментів: 1) вони мають бути міцно зв'язаними з мембраною; 2) не підлягати інгібуванню чи активації при розділенні фракцій; 3) міститися виключно в даному типі мембрани [33]. Застосування маркерів варіює залежно від типу клітин. Наприклад, глюкозо-6-фосфатаза є маркерним ферментом клітин, у яких відбувається глікоконез.

При дослідженні гомогенатів тканин необхідна реєстрація активності багатьох маркерів, за результатами чого будується таблиця розподілу активностей (табл. 4) [7]. Така таблиця дозволяє оцінити розподіл та активність субклітинних маркерів, ступінь збагачення ними відповідних субклітинних фракцій порівняно з гомогенатом і забруднення іншими клітинними компонентами.

Таблиця 4. Значення ензиматичних активностей плазматичних мембран гладеньких м'язових клітин, нмоль Р_n / мг (білка) · хв [33]

Активність	Середовище та спосіб визначення	Значення активності, $M \pm m$
5'-нуклеотидазна	50 ммоль/л трис-НCl, рН 7,4-7,8; 1 ммоль/л MgCl ₂ ; 4 ммоль/л АМФ; 100–500 мкг білка	142 ± 13 $p < 0,05$
Загальна Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза	10 ммоль/л NaCl; 20 ммоль/л KCl; 5 ммоль/л MgCl ₂ ; 3 ммоль/л АТФ; 100 мкмоль/л оуабаїну, 1,5 ммоль/л імідазол-НCl, рН 7,2	1350 ± 77 $p < 0,05$
Mg ²⁺ -АТФаза	5 ммоль/л MgCl ₂ ; 3 ммоль/л АТФ; 100 мкмоль/л оуабаїну, 1,5 ммоль/л імідазол-НCl, рН 7,2	1200 ± 67 $p < 0,05$
Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза	За різницею між Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ -АТФазної активності у присутності 0,1 ммоль/л оуабаїну	215 ± 37 $p < 0,05$
Mg ²⁺ , Ca ²⁺ -АТФаза	За приростом активностей при додаванні мікромолярних концентрацій CaCl ₂	375 ± 45 $p < 0,05$

Чим вищим є ступінь збагачення даного мембранного препарату ферментним маркером (що фіксується за збільшенням його активності відносно вихідного гомогенату), тим більш гомогенним є отриманий препарат. Для різних маркерів можна отримати ступінь збагачення від 5 до 50. За допомогою такого методу було виділено основні органели й мембрани багатьох тваринних клітин.

Активність маркерних ферментів вимірюють якнайшвидше після виділення, препарат не заморожують і зберігають за 4°C. Наприклад, галактозилтрансферазну активність мембран апарату Гольджі слід визначати в щойно отриманих субклітинних фракціях [7].

Для правильної оцінки розподілу ферменту-маркеру суттєвим є просторове розташування субстратзв'язуючої ділянки в замкнених везикулах.

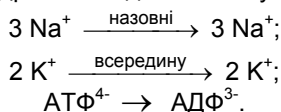
З метою найбільш ефективного контролю чистоти мембранного препарату проводять визначення двох–трьох маркерних ферментів, специфічних для даного типу мембрани. Недоліком даного методу є те, що одні й ті самі ферменти можуть бути маркерами для різних субклітинних структур. Зокрема, активність 5'-нуклеотидази, крім як у плазматичній мембрані, може бути виявлено в ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі [33].

За допомогою відповідних специфічних маркерів у даній мембранній фракції можна встановити наявність домішок цитоплазматичних органел. Для зменшення ступеня забруднення препаратів внутрішньоклітинними мембранами найчастіше необхідно проведення повторного центрифугування у градієнті густини або розділення за швидкістю седиментації. Ступінь забруднення кінцевої фракції визначають, помножуючи показник ступеня очищення за маркером даних органел, що присутні у фракції поверхневих мембран, на вміст білка (у відсотках) у цих органелах у вихідному гомогенаті. Для таких розрахунків потрібен повний набір даних щодо фракціонування досліджуваних тканин або типів клітин [8].

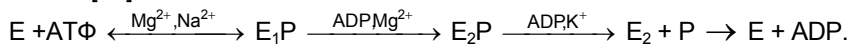
Нижче наведено характеристику деяких маркерних ферментів мембран клітинних органел.

2.3.1. Na⁺, K⁺-АТФаза плазматичних мембран

Оубаїнчутлива Na⁺,K⁺-АТФаза (АТФ-фосфогідролаза, КФ 3.6.1.37) є маркерним ферментом плазматичної мембрани клітин більшості тканин, який здійснює sprzęження гідролізу АТФ з активним транспортом іонів проти електрохімічного градієнта [13]. Вона має трансмембранну локалізацію, тобто є інтегральним білком, і виконує функцію Na⁺,K⁺-насосу: три іони Na⁺ виводяться з клітини, а всередину клітини надходять два іони K⁺, що супроводжується гідролізом однієї молекули АТФ [25; 34]:



Гідроліз АТФ цією ферментною системою відбувається за наступною схемою [24]:



Активация ферменту відбувається у присутності іонів Na⁺ та Mg²⁺ на внутрішній поверхні плазматичної мембрани, що викликає фосфорилю-

вання ферменту за рахунок кінцевої γ -фосфатної групи АТФ з утворенням проміжного комплексу EP. Ця стадія інгібується іонами Ca^{2+} й не пригнічується оуабаїном. Утворений фосфорильований продукт EP підлягає розпаду, що стимулюється іонами K^+ на зовнішній поверхні мембрани. Разом із цим натрій вивільняється у позаклітинне середовище, а калій надходить усередину клітини. Ця стадія калійзалежного гідролізу ферменту інгібується серцевим глікозидом оуабаїном. При гідролізі фосфорильованого комплексу вивільнюється енергія, необхідна для транслокації K^+ крізь мембрану в цитоплазму. Вважається, що фосфорильований фермент може перебувати у двох конформаційних станах: E_1P та E_2P , рівновага між яким контролюється іонами Mg^{2+} , причому перша форма має більшу спорідненість з ADP, а друга – з K^+ . Докладно вивчено кінетику взаємодії Na^+, K^+ -АТФази з її субстратом АТФ, а також вплив на неї різних лігандів [9].

Na^+, K^+ -АТФаза має молекулярну масу 250–300 кДа і складається з двох субодиниць (рис. 4) [23; 75]. α -Субодиниця являє собою ліпопротеїд (100 кДа) і містить центри зв'язування іонів Na^+ і K^+ та гідролітичний центр, що є локалізованим на зовнішній поверхні плазматичної мембрани й фосфорилується при транслокації іонів. β -Субодиниця є сіалоглікопротеїдом (40 кДа) і, на відміну від α -субодиниці не пронизує ліпідний бішар, а є вмонтованою в мембрану на зовнішній поверхні [57]. Вважається, що ця субодиниця виконує регуляторні функції, зокрема, забезпечує правильну орієнтацію Na^+, K^+ -АТФази в мембрані та відповідає за її антигенні властивості. Оскільки обидві субодиниці беруть участь у зв'язуванні оуабаїну на зовнішній поверхні, вважається, що цей фермент є інтегральним білком плазматичної мембрани [24].

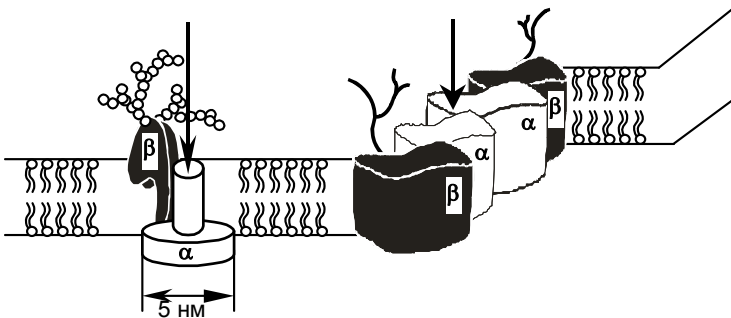


Рис. 4. Моделі будови Na^+, K^+ -АТФази [23]

(ліворуч – незалежне функціонування $\alpha\beta$ -протомера з проходженням катіонів крізь канал в α -субодиниці; праворуч – $(\alpha\beta)_2$ -протомерна структура з іонним каналом у просторі між двома α -субодиницями)

α -Субодиниця пронизує ліпідний бішар й утворює 6 або 8 трансмембранних сегментів. Центр зв'язування глікозидів розташований на α -

субодиниці на зовнішній поверхні мембрани, а центр фосфорилування – із цитоплазматичної поверхні (рис. 5) [23].

Основна маса α -субодиниці є зосередженою на цитоплазматичній поверхні мембрани, утворюючи виступ порядку 5 нм. β -Субодиниця розташована на зовнішній поверхні мембрани й має, ймовірно, тільки один трансмембранний сегмент. У безпосередньому контакті з ліпідним матриксом мембрани перебувають α - та β -субодиниці Na^+, K^+ -АТФази.

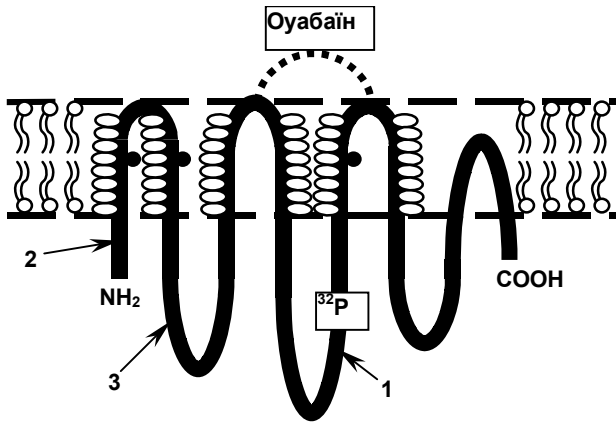


Рис. 5. Модель розташування α -субодиниці Na^+, K^+ -АТФази всередині ліпідного бішару мембрани [23].

(пронумеровані стрілки вказують на ділянки поліпептидного ланцюга, за якими відбувається розщеплення трипсином у присутності KCl і NaCl)

Загальновізвано, що в нативному стані Na^+, K^+ -АТФаза є олігомерним ансамблем α - та β -субодиниць, стехіометрія яких, за даними різних авторів, значно варіює: 2 : 1, 3 : 2, 4 : 2 та ін. Вважається, що ступінь олігомеризації субодиниць є пов'язаним з особливостями функціонування натрієвого насосу в різних фізіологічних умовах. Ймовірно, $\alpha\beta$ -протомер є тією мінімальною структурою, яка здійснює як гідроліз АТФ, так і транспорт Na^+ і K^+ . Спряження цих двох функцій і забезпечує активний транспорт-перенесення Na^+ (із цитоплазми в позаклітинне середовище) та K^+ (у протилежному напрямку) проти електрохімічного градієнта за рахунок енергії гідролізу АТФ, що забезпечує підтримання різниці потенціалів на мембрані (порядку 90 мВ) [23]. Інакше кажучи, енергія гідролізу АТФ перетворюється на електрохімічний потенціал, за рахунок якого забезпечуються не тільки процеси збудження й осморегуляції та регулюються міжклітинні взаємодії, а й створюються умови для регуляції окремих стадій клітинного циклу [11].

Широко досліджується взаємодія Na^+, K^+ -АТФази з її інгібітором оубаїном [34]. Відомо, що Na^+, K^+ -АТФаза, крім активного центру, центрів

зв'язування Na^+ , K^+ і Mg^{2+} , має центр зв'язування оуабаїну (та інших серцевих глікозидів), розташований на α -субодиниці й локалізований на зовнішній поверхні мембрани. Оуабаїн, зв'язуючись із цим центром, відокремлений від внутрішньоклітинного центру ферменту ліпідним бішаром, ефективно (достатньо його концентрації 10^{-5} моль/л) пригнічує спряжений Na^+/K^+ -транспорт і повністю інгібує Na^+,K^+ -АТФазну активність [51]. У зв'язку із цим фермент Na^+,K^+ -АТФаза отримав умовну назву "дігіталіс-рецептор" (як відомо, серцеві глікозиди вперше було виділено з рослини наперстянка – *Digitalis purpurea*) [23].

Показано, що спорідненість оуабаїнзв'язуючого центру Na^+,K^+ -АТФази до серцевих глікозидів регулюється тими самими лігандами, які алостерично модифікують конформацію α -субодиниці. Виявлено, що дві групи лігандів сприяють зв'язуванню оуабаїну з рецепторним центром ферменту: 1) Na^+ , Mg^{2+} і АТФ; 2) Mg^{2+} і P_i . Оскільки обидві групи "індукують" конформаційний стан ферменту E_2P , було зроблено висновок, що саме із цією конформацією найлегше зв'язуються серцеві глікозиди. Крім цього, було показано, що оуабаїн зменшує спорідненість іонів калію із ферментом і не впливає на константу дисоціації для Na^+ . У присутності АТФ і Mg^{2+} натрій підвищує, а калій знижує швидкість взаємодії оуабаїну з АТФазою [74]. Вважається, що Na^+,K^+ -АТФазна система взаємодіє з оуабаїном, коли рецептор розташований на зовнішній поверхні мембрани. Строфантин, що є, як і інші серцеві глікозиди, специфічним інгібітором натрій-калієвого насоса, діє тільки ззовні мембрани [23].

Накопичено великий експериментальний матеріал щодо існування в різних тканинах тварин ізоферментів Na^+,K^+ -АТФази, які суттєво відрізняються за чутливістю до оуабаїну та інших серцевих глікозидів. Ці ізоформи отримали назву "оуабаїнчутливі" та "стійкі до оуабаїну". Порівняльний аналіз цих форм показав, що оуабаїнчутлива форма містить в α -субодиниці "надлишковий" фрагмент з молекулярною масою 2 кДа порівняно зі стійкою до оуабаїну формою. Тому в подальшому ці ізоферменти стали позначати як $\alpha(+)$ - та α -субодиничні форми Na^+,K^+ -АТФази, що відрізняються за чутливістю до оуабаїну. Потім вдалося встановити, що чутлива до дії оуабаїну форма Na^+,K^+ -АТФази утворюється у процесі біосинтезу, а не внаслідок модифікації молекули, оскільки ця властивість ферменту зберігається при його очищенні й виявляється у відсутності фізіологічних лігандів (тобто не індукується ними).

При вивченні Na^+,K^+ -АТФази з мікросом мозку бика було з'ясовано, що її оуабаїнчутлива АТФазна активність інгібується ЕДТА в концентрації 1–10 ммоль/л, тоді як ЕГТА справляє на фермент слабкий вплив [34]. Імовірно, це пов'язано з конкуренцією хелатуючих речовин з АТФ за іони магнію, що призводить до зменшення істинного субстрату АТФазної реакції – $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$.

Виявлено, що експресія генів Na^+,K^+ -АТФази стимулюється дегідрокортикостероном і модулюється внутрішньоклітинним рівнем іонів Na^+ .

Отже, Na^+, K^+ -АТФаза є векторним ліпідзалежним ферментом плазматичних мембран, який забезпечує спряжене перенесення іонів Na^+ і K^+ проти їх електрохімічних градієнтів за рахунок енергії гідролізу АТФ [23]. У цьому розумінні Na^+, K^+ -АТФазу як еквівалент натрієвого насосу можна віднести до основних об'єктів досліджень біоенергетики, оскільки іонні градієнти, які формуються цим ферментом, забезпечують енергетично "найважливіші вияви життєдіяльності" [13].

2.3.2. Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулула

Ca^{2+} -АТФаза (КФ 3.6.1.38.) – маркерний фермент мембран саркоплазматичного ретикулула (СР), що забезпечує закачування кальцію із цитоплазми всередину СР. Як і Ca^{2+} -АТФаза плазматичних мембран, вона здатна утворювати більш ніж 1000-кратний градієнт Ca^{2+} [24]. Її може бути виявлено переважно в термінальних цистернах і поздовжніх трубочках ретикулула скелетних м'язів [10].

На Ca^{2+} -АТФазу припадає більше 70 % вмісту всіх білків у саркоплазматичному ретикулумі. Відомо, що СР спеціалізовану ендомембранну систему, що складається із сполучених одна з одною цистерн, трубочок і пухирців, якій належить основна роль у регуляції концентрації вільного кальцію в цитозолі.

Контакт між сарколемою (плазматичною мембраною міоцитів) і саркоплазматичним ретикулумом здійснюється за рахунок так званої Т-системи, яка складається з поперечних трубочок сарколеми. При передачі нервового імпульсу через нервово-м'язові синапси хвиля деполаризації від сарколеми через Т-систему досягає мембран СР, що викликає вихід кальцію із цистерн, де він депонується, коли м'яз перебуває у стані спокою. При розслабленні м'язу відбувається поглинання Ca^{2+} СР за рахунок ефективної роботи Ca^{2+} -АТФази (кальцієвого насосу). При цьому концентрація вільного кальцію в цитозолі зменшується в декілька тисяч разів до величини порядку 10^{-7} моль/л, і на мембрані формується градієнт Ca^{2+} [10].

При гідролізі однієї молекули АТФ Ca^{2+} -АТФаза переносить два іони Ca^{2+} з навколишнього середовища всередину везикул СР (рис. 6).

Перенесення іонів кальцію супроводжується транспортом електричних зарядів, проте різниця потенціалів на мембрані не утримується, тому що мембрана СР є добре проникною для інших іонів. Транспорт кальцію здійснюється з високим коефіцієнтом корисної дії, майже без втрат енергії. До того ж, Ca^{2+} -АТФаза може працювати у зворотному напрямку: стає можливим отримання АТФ з АДФ і неорганічного фосфату, якщо навантажити везикулу СР кальцієм, а потім видалити його з навколишнього середовища шляхом додавання комплексону (сполуки, що зв'язує кальцій) [15].

Кожен цикл перенесення Ca^{2+} під дією Ca^{2+} -АТФази, як і для інших протонних насосів, включає в себе три стадії: 1) захоплення іона з однієї поверхні мембрани; 2) транслокація через мембрану; 3) вивільнення на

іншому боці. Оскільки здійснення цих реакцій є спряженим з гідролізом АТФ, молекула останнього повинна бути захоплена (рис. 7, 1) й гідролізована з використанням енергії на перенесення кальцію (рис. 7, 2), а його продукти (АДФ і фосфат) мають перейти із зв'язаного із ферментом стану у водний розчин (рис. 7, 3). Отже, під час кожного циклу фермент одночасно використовує не один, а два субстрати (внутрішньоклітинний Ca^{2+} та АТФ) з утворенням трьох продуктів (кальцій, що накопичується всередині везикул СР, АДФ і ортофосфат).

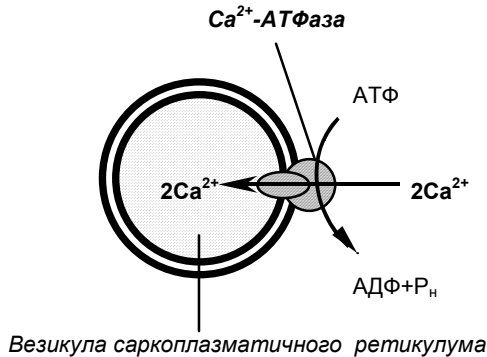


Рис. 6. Схематичне зображення везикули саркоплазматичного ретикулума із вбудованою в нею молекулою Ca^{2+} -АТФази [15]

("Голівка" ферменту (діаметр ≈ 9 нм) звернена в зовнішнє середовище (цитоплазму), з нею зв'язуються АТФ та іони Ca^{2+} . При гідролізі АТФ Ca^{2+} переноситься всередину везикули через трансмембранний канал.)

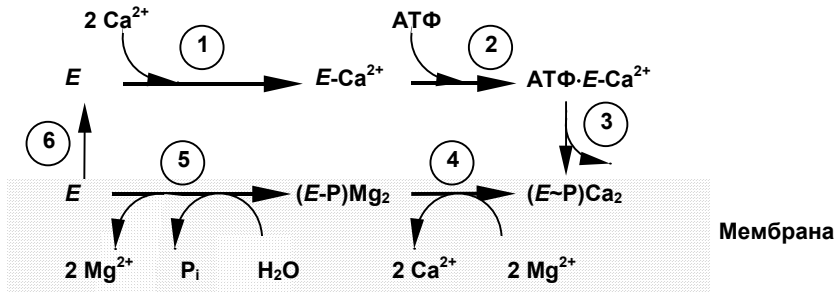


Рис. 7. Послідовність стадій роботи Ca^{2+} -АТФази:

- 1 – зв'язування іонів кальцію; 2 – зв'язування АТФ;
- 3 – утворення фосфоферменту; 4 – відщеплення іонів кальцію;
- 5 – гідроліз фосфоферменту; 6 – повернення ферменту у вихідний стан

Важливо, що стадії перетворення АТФ під час роботи Ca^{2+} -АТФази чергуються зі стадіями перенесення Ca^{2+} (рис. 7). Це такі стадії: 1) зв'я-

зування двох іонів кальцію на поверхні ферменту, спрямованого в цитоплазму (у клітині) або назовні (в ізольованих пухирцях саркоплазматичного ретикулума); 2) зв'язування молекул АТФ на тій самій поверхні; 3) фосфорилування білка (утворення фосфоферменту) та вивільнення АДФ; 4) вивільнення іонів кальцію з поверхні Ca^{2+} -АТФази, спрямованої всередину пухирців СР, та зв'язування іонів магнію; 5) гідроліз фосфатного зв'язку та відщеплення іонів магнію; 6) перехід молекули ферменту у вихідний стан (центри зв'язування кальцію та АТФ знову розташовані на поверхні пухирців СР).

Вивчення механізму транспорту кальцію під дією Ca^{2+} -АТФази проводилось на пухирцях саркоплазматичного ретикулума, отриманих після гомогенізації тканин шляхом послідовного центрифугування. За допомогою процедури дезоксихолатного діалізу очищена Ca^{2+} -АТФаза може бути успішно вбудована у везикули. При вбудовуванні поліпептидного ланцюга Ca^{2+} -АТФази в гідрофобну зону мембрани цих пухирців утворюються глобулярні внутрішньомембранні часточки діаметром 9 нм, які є зручною моделлю для вивчення структури та функцій цього ферменту [15]. У деяких препаратів реконструйований фермент утворює більш великі агрегати, ніж димери, хоч фізіологічне значення цього процесу не є з'ясованим.

На сьогодні найбільш дослідженими є структура, внутрішньомембранна локалізація Ca^{2+} -АТФази та механізми регуляції її каталітичної і транспортної активностей [19; 23; 101]. Цей фермент характеризується більш простою структурою порівняно з іншими іонними насосами: Na^+ , K^+ - та H^+ -АТФазами. Вона являє собою високомолекулярний односубодиничний білок з молекулярною масою 110–115 кДа. За результатами секвенування відповідного гена встановлено амінокислотну послідовність білка. Порівняно з іншими інтегральними білками біомембран Ca^{2+} -АТФаза є менш гідрофобною.

За допомогою специфічного розщеплення трипсином було отримано два фрагменти молекули Ca^{2+} -АТФази: фрагмент А (55–58 кДа) і фрагмент В (45–55 кДа). Фрагмент А було розділено на субфрагменти A_1 та A_2 з молекулярними масами 30–33 та 20–24 кДа відповідно, за допомогою чого було виявлено локалізацію важливих функціональних центрів Ca^{2+} -АТФази. У складі субфрагменту A_1 було знайдено центр фосфорилування – аспартильний залишок, який фосфорилується АТФ. Було також показано, що в субфрагменті A_2 локалізований центр зв'язування Ca^{2+} .

Відомості про вторинну структуру Ca^{2+} -АТФази є дуже обмеженими. Вважається, що в молекулі цього ферменту близько 30 % амінокислотних залишків перебувають у вигляді антипаралельного бішару, близько 40 % припадає на α -спіральні ділянки. Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулума, як і багато інших векторних ферментів біомембран (наприклад, аденілатциклаза, Na^+ , K^+ -АТФаза), є типовим ліпідзалежним ферментом, гідрофобний домен якого безпосередньо контактує з "прикордонними" ліпідами бішару [23]. У мембрані саркоплазматичного ретику-

лума фермент, імовірно, утворює димери, але мономерна форма в міцелах детергента зберігає основні кінетичні властивості.

На даних про амінокислотну послідовність Ca^{2+} -АТФази та про внутрішньомолекулярне розміщення всіх її відомих фрагментів базуються уявлення про внутрішньомембранне розташування цього векторного ферменту. Відомо, що поліпептидний ланцюг Ca^{2+} -АТФази утворює в ліпідному бішарі 11 гідрофобних фрагментів, більша частина яких з'єднана ззовні короткими поліпептидними зв'язками (рис. 8). Крім цього, вона формує дві протяжні гідрофільні "петлі" із цитоплазматичної та зовнішньої поверхонь мембрани, де локалізовані N- та С-кінцеві послідовності (рис. 9). Перша петля розташована між α -спіралями M2 і M3, а друга – між α -спіралями M4 і M5 [15]. Довга петля містить АТФ-зв'язуючу ділянку, до складу якої входить залишок аспарагінової кислоти, до якої приєднаний фосфат. Зв'язування іонів Ca^{2+} відбувається на ділянці, утвореній малою петлею (між α -спіралями M2 і M3) за участі амінокислотних залишків, що належать до спіралей M1 і M4. У місцях зв'язування розміщуються кілька залишків аспарагінової кислоти, які несуть від'ємні заряди.

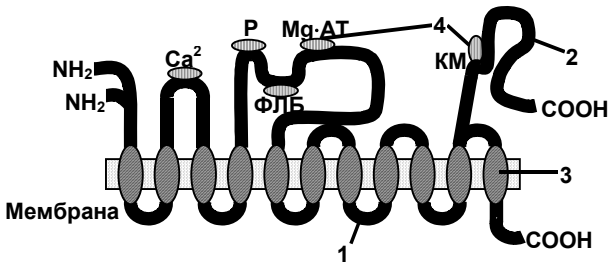


Рис. 8. Загальна схема будови Ca^{2+} -АТФази [15]:

- 1 – поліпептидний ланцюг Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума;
- 2 – ділянки ланцюга Ca^{2+} -АТФази цитоплазматичної мембрани; 3 – α -спіральні ділянки, які пронизують мембрану (M₁ і M₂); 4 – ділянки зв'язування: Ca^{2+} – іони кальцію, Mg-АТФ – молекули АТФ, ФЛБ – фосфоламбану (у Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума), КМ – кальмодуліну (у цитоплазматичної Ca^{2+} -АТФази), P – ділянка фосфорилування

Існують дані про структурну гомологію активних центрів Ca^{2+} -АТФази та інших транспортних АТФаз, у тому числі Na^+ , K^+ -АТФази. Припускається, що за аналогією з H^+ -АТФазою, в якій каталітична (АТФазна) й транспортна (перенесення протонів) функції реалізуються в різних субодиницях – F₁ і F₀, подібний поділ функцій існує також всередині молекули Ca^{2+} -АТФази, але не за рахунок різних субодиниць, а внаслідок існування доменів. Імовірно, каталітична й транспортна активності є локалізованими в різних доменах цього ферменту, взаємодія яких і забезпечує роботу кальцієвого насоса – транспорт кальцію за рахунок енергії АТФ проти електродімічного градієнта [55].

За сучасними уявленнями, конформаційні переходи молекули Ca^{2+} -АТФази відіграють вирішальну роль у забезпеченні активного транспорту Ca^{2+} проти електрохімічного градієнта [99].

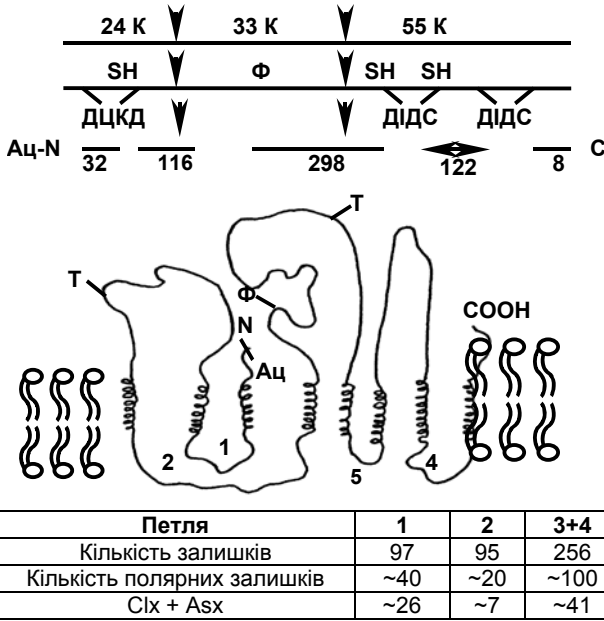


Рис. 9. Локалізація різних ділянок та відомих гідрофільних послідовностей всередині поліпептидного ланцюга Ca^{2+} -АТФази [23]:

T – ділянки, які розщеплюються трипсином: 24, 33, 55 кДа – продукти обмеженого трипсинолізу; Ф – ділянка фосфорилування; SH- залишки цистеїну, локалізовані на оберненій до цитозолу поверхні мембрани; ДЦКД – ділянка зв'язування дициклогексилкарбодіміду; ДІДС – ділянка зв'язування 4,4'-діізотіоціано-2,2'-стильбендинсульфонату; 32, 116, 298 і 8 – фрагменти з відомою послідовністю; Ac-N – ацетильована N-кінцева ділянка; COOH – C-кінцевий залишок

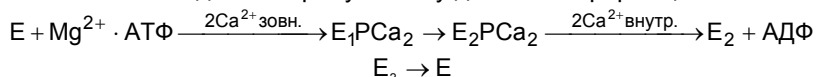
Ca^{2+} -АТФаза активується низькими концентраціями Ca^{2+} з $K_a = 10^{-7}$ моль/л; високі концентрації (1–5 ммоль/л) гальмують активність цієї транспортної системи [24].

Кожна молекула Ca^{2+} -АТФази містить два Ca^{2+} - та один АТФ-зв'язуючий центри. Останній за умови наявності градієнта Ca^{2+} здатен знову фосфорилуватись у присутності Mg^{2+} (або Mn^{2+}), АДФ та P_n [34]. Показано, що зв'язування комплексу Mg-АТФ відбувається незалежно від Ca^{2+} . Це означає, що фермент має два різні центри зв'язування для Ca^{2+} та для Mg-АТФ. Константа зв'язування Mg-АТФ становить $2 \cdot 10^{-5}$ ммоль/л, що вказує на велику спорідненість активного центру ферменту до субстрату (половина молекул АТФ зв'язуються за його концентрації 5 мкмоль/л [15]).

Поряд із центром зв'язування з високою спорідненістю молекула Ca^{2+} -АТФази має другий центр з низькою спорідненістю, який не бере участі у процесі гідролізу АТФ і перенесення кальцію, а, можливо, має значення для регуляції активності ферменту. Центри зв'язування двох іонів кальцію та АТФ взаємодіють між собою, оскільки зв'язування Ca^{2+} запускає гідроліз АТФ, приєднаного разом з Mg^{2+} до свого центру. Гідроліз АТФ починається тільки після того, як обидва іони кальцію приєднуються до своїх ділянок зв'язування. Це відповідає стехіометрії перенесення кальцію та гідролізу АТФ, що дорівнює 2. Знайдено два види фосфоферменту, перетворення яких супроводжується транслокацією Ca^{2+} крізь мембрану.

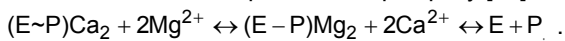
Гідроліз АТФ під дією Ca^{2+} -АТФази здійснюється у три етапи. Спочатку відбувається зв'язування АТФ, потім фосфорилування білка й відщеплення АДФ, і, нарешті, гідролітичне розщеплення зв'язку між білком та фосфатом і вивільнення ортофосфату. Фосфорилування здійснюється за карбоксильною групою залишку аспарагінової кислоти.

Вважається, що в ході АТФ-гідролізного реакційного циклу молекули Ca^{2+} -АТФази послідовно перебувають у деяких конформаційних станах:



Кінетичні дослідження показали, що Ca^{2+} -АТФаза може перебувати, як мінімум, у двох фосфорильованих станах (формах) – $\text{E}_1 \approx \text{P}$ та $\text{E}_2 \approx \text{P}$, які відрізняються за своєю чутливістю до різних лігандів. Для форми $\text{E}_1 \approx \text{P}$ характерний високий рівень вільної енергії; вона є дуже чутливою до АДФ (при його додаванні вона деструктується з утворенням АТФ) і має високу спорідненість з Ca^{2+} , які присутні в зовнішньому середовищі. Форма $\text{E}_2 \approx \text{P}$ характеризується низьким рівнем вільної енергії і є нездатною до утворення АТФ при додаванні АДФ, проте за високої концентрації Ca^{2+} в середовищі вона може переходити у форму E_1P . Загальнознано, що саме перехід із стану E_1PCa_2 (див. вище формулу) у стан E_2PCa_2 є тим критичним етапом, коли має відбуватися спряження процесу гідролізу АТФ із транслокацією зв'язаного із ферментом Ca^{2+} [23].

Високоенергетична форма фосфорильованої Ca^{2+} -АТФази є стабільною тільки у присутності мілімолярних (тобто високих) концентрацій іонів кальцію, за менших концентрацій відбувається витіснення Ca^{2+} з кальційзв'язуючих центрів фосфоферменту іонами Mg^{2+} (які присутні в середовищі і без яких АТФаза не працює) та вихід іонів кальцію в оточуючий розчин. Таке витіснення іонів кальцію з кальційзв'язуючих центрів високоенергетичного фосфорильованого похідного білка іонами Mg^{2+} відбувається у два етапи: спочатку відщеплюється кальцій, і тільки потім гідролізується фосфатний зв'язок із відщепленням неорганічного фосфату [15]:



Кальцієвий і магнієвий комплекси фермент-фосфату принципово відрізняються за їхньою здатністю вступати в реакцію з АДФ з утворенням

АТФ. Комплекс кальцію із фосфорильованим ферментом, що існує тільки за високих концентрацій кальцію, може перетворитися на вихідну Ca^{2+} -АТФазу із синтезом АТФ, оскільки в даному комплексі (Е-Р) фосфат поєднаний з білком макроергічним зв'язком. Проте комплекс фермент-фосфату не здатен передавати фосфат на АДФ, оскільки при гідролітичному розщепленні фосфату не виділяється достатньо енергії для такої реакції, і тому зв'язок фосфату з білком не є макроергічним (Е-Р).

Енергія фосфатного зв'язку використовується замість константи зв'язування кальцію з АТФазою. Показано, що при фосфорильованні константа зв'язування Ca^{2+} зменшується більш ніж у 1000 разів, тобто стає менше $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л [15]. У розчині Ca^{2+} концентрацією 0,5 моль/л половина всіх зв'язаних раніше іонів кальцію після фосфорильовання білка від'єднується від АТФази та переходить у розчин. За концентрації 1 ммоль/л іонів кальцію в середовищі у зв'язаному стані перебувають дві третини іонів, решта переходить у розчин. Наявність іонів магнію в середовищі додатково зменшує кількість зв'язаного кальцію, оскільки у фосфорильованій АТФазі різниця у спорідненості Ca^{2+} з Mg^{2+} є не дуже значною. Отже, енергія АТФ іде на те, щоб АТФаза витіснила в концентрований розчин іони Ca^{2+} , які фермент приєднав у розведеному розчині.

Перенесення іонів кальцію через мембрану СР забезпечується за рахунок орієнтації молекули Ca^{2+} -АТФази таким чином, що зв'язування Ca^{2+} і АТФ відбувається на зовнішній поверхні мембрани, а вивільнення Ca^{2+} – на внутрішньому. Після фосфорильовання ферменту кальційзв'язуючі центри стають доступними з внутрішньої поверхні й недоступними із зовнішнього, тому фосфорильовання викликає перенесення центрів зв'язування кальцію через мембрану (транслокація). Під час цієї транслокації відбуваються конформаційні зміни білкової молекули та зміни спорідненості центрів зв'язування до іонів кальцію [15].

Комплекс фосфорильованого ферменту з магнієм швидко гідролізується, і фермент набуває своїх вихідних властивостей при відновленні своєї конформації та появи центрів зв'язування з високою спорідненістю. Вважають, що стадія гідролізу АТФ зумовлює звільнення центрів зв'язування від магнію та до їх зворотної транслокації. У результаті центри на зверненій назовні поверхні ферменту знову набувають високу спорідненість з Ca^{2+} . Таким чином, дефосфорильовання комплексу Е-Р призводить до просторового переміщення ділянки білкової молекули та змін енергії зв'язування цих іонів (у протилежному напрямку по відношенню до фосфорильовання АТФази).

Як було зазначено раніше, стехіометрія процесу транспорту та гідролізу АТФ в ідеальному варіанті дорівнює 2. Вона інгібується рутенієвим червоним, –SH-реагентами та ін. При цьому блокується транспорт кальцію та змінюється іонна селективність ферменту. Швидкість зворотного виходу Ca^{2+} із СР близька до швидкості його дифузії у воді (10^{-7}

моль/см²·с), проте істинний механізм цього процесу невідомий [24]. Вважають, що Ca²⁺-АТФаза є основним інтегральним білком мембран саркоплазматичного ретикулула, яка не тільки активно транспортує кальцій у систему СР, а й здатна формувати гідрофільний канал, який забезпечує вихід даного катіона за певних умов.

Регуляція активності кальцієвих АТФаз клітинних депо (наприклад, ендоплазматичного ретикулула) відбувається за участі особливого білка – фосфоламбану, який зв'язує ділянку поліпептидного ланцюга АТФази поблизу місця фосфорилювання й пригнічує роботу ферменту шляхом зменшення спорідненості ділянок зв'язування Ca²⁺ із цим іоном [15]. За необхідності внутрішньоклітинні регуляторні системи забезпечують відщеплення фосфоламбану від АТФази, в результаті чого її робота відновлюється. Це здійснюється за рахунок фосфорилювання фосфоламбану протеїнкіназами, як наслідок – останній втрачає здатність зв'язуватися з Ca²⁺-АТФазою та інгібувати її активність.

Порушення активності Ca²⁺-АТФази мають місце за деяких патологій, зокрема, її зниження за гіпертонії, що призводить до зростання вмісту внутрішньоклітинного кальцію, стимуляції м'язового скорочення і як наслідок – підвищення тонуусу судин. Причиною такого пригнічення активності вважають інтенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення, оскільки фермент є дуже чутливим до ліпопероксидації, під час якої відбувається окиснення SH-груп його активного центру.

Існує низка питань, в тому числі тих, що стосуються регуляторних механізмів функціонування Ca²⁺-АТФази як векторного ферменту, які потребують подальшого вивчення і є важливими для кращого розуміння основ мембранної ензимології.

2.4. ОЧИЩЕННЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

Мембранні білки є одними з найважливіших складових мембрани, оскільки вони беруть участь у різних процесах обміну речовин. Очищення й аналіз таких білків ставлять перед дослідниками цілу низку специфічних проблем, з якими вони зазвичай не стикаються, працюючи з розчинними білками. Мембранні білки, як правило, не розчинні у воді й погано розчиняються в органічних розчинниках. Тому для їх солюбілізації й очищення доводиться застосовувати детергенти або інші речовини, які руйнують мембрану.

Мембранні білки розподіляють на зовнішні (периферичні) і внутрішні (інтегральні) відповідно до тих методів, які застосовують для їх солюбілізації. Периферичні білки вдається солюбілізувати, майже не порушуючи цілісності мембрани, тоді як виділення інтегральних білків зазвичай потребує її руйнування. Вивчення хімічної природи білків ускладнено тим, що вони в мем-

брані перебувають у комплексі з ліпідами та вуглеводами, тому для дослідження таких білків застосовуються різні хімічні та фізичні методи.

Для виділення інтегральних мембранних білків існує багато спеціальних методів, проте більшість схем очищення ґрунтується на тих самих хроматографічних і гідродинамічних методиках, які використовують для розчинних білків. Це хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі, сефарозі чи гідроксилапатиті, гель-фільтрація, центрифугування у градієнті густини сахарози і т.д. Оскільки виділення інтегральних білків зазвичай пов'язано з руйнуванням мембрани, в багатьох випадках слід упевнитися, що у процесі виділення й очищення білка його функціональна активність не виявилась порушеною або втраченою. Для цього, зокрема, можна спробувати провести реконструкцію, тобто знову вбудувати очищений білок у мембрану. Функціональну активність деяких мембранних білків, таких як іонні канали або транспортні білки можна охарактеризувати й виміряти тільки в реконструйованих мембранних системах. Для інших мембранних білків, які виконують функції ферментів і рецепторів, корисні відомості можна отримати, використовуючи солюбілізовані препарати.

Методи солюбілізації та реконструкції не тільки надають цінну інформацію щодо функцій мембранних білків; їх можна також використовувати для того, щоб перевести ці білки у стан, зручний для проведення детального структурного аналізу. Ключову роль у вдосконаленні методів виділення мембранних білків відіграють детергенти.

2.4.1. Солюбілізація мембранних білків

Для очищення інтегральних мембранних білків й одержання їх у біохімічно активній формі необхідні детергенти, що дозволяють солюбілізувати білки й зберегти їх у розчині [85]. Для цього інтегральні білки необхідно екстрагувати з мембранного бішару і вмонтувати в детергентні міцели [71]. Сьогодні для виділення таких білків застосовується ціла низка детергентів з різною хімічною структурою.

Детергенти – це амфіпатичні молекули, що містять полярні групи ("голівка") та довгий вуглеводневий гідрофобний ланцюг ("хвіст"). На відміну від повністю полярних чи неполярних молекул, амфіпатичні молекули виявляють унікальні властивості у воді. Їх полярні групи утворюють водневі зв'язки з молекулами води, тоді як вуглеводневий ланцюг агрегує внаслідок гідрофобних взаємодій. Ці властивості дозволяють детергентам розчинятись у воді. У водний розчинах вони формують сферичні структури – *міцели* (рис. 10), кожна з яких містить кілька детергентних молекул. Унаслідок своєї амфіпатичної природи детергенти здатні солюбілізувати гідрофобні структури у воді.

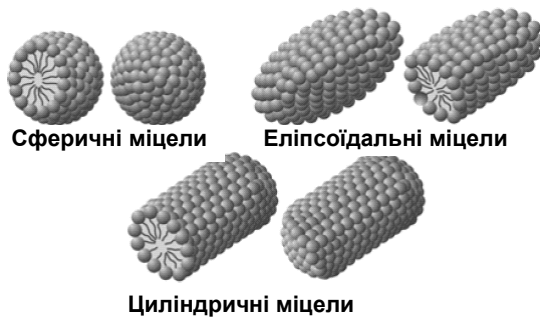


Рис. 10. Детергентна міцела у воді

Залежно від своєї структури й концентрації у водному розчині детергенти можуть утворювати різні типи міцел (рис. 11). Сферичні міцели мають мінімальні розміри (близько 4 нм) і зазвичай існують в ділянці концентрацій, які ненабагато перевищують критичну концентрацію міцелутворення (ККМ) [4]. Із зростанням концентрації детергента сферичні міцели переходять у циліндричні (чи паличкоподібні) міцели, середня довжина яких залежить від концентрації детергента. Еліпсоїдальні міцели утворюють детергенти, в яких співвідношення між розмірами полярної та неполярної ділянок молекули може змінюватися, а також детергенти в суміші з іншими амфифільними сполуками

Один з методів визначення ККМ базується на здатності детергентів солюбілізувати гідрофобні барвники. Детергенти також називають *сурфактантами*, оскільки вони зменшують поверхневий натяг у воді.

Детергенти солюбілізують мембранні білки, копіюючи їх ліпідне двохарове оточення. Міцели, утворені за допомогою детергентів, є аналогічними бішарам, що формують біологічні мембрани. Білки вбудовуються в такі міцели за допомогою гідрофобних взаємодій.



Сферичні міцели

Еліпсоїдальні міцели

Циліндричні міцели

Рис. 11. Різні типи міцел, утворених детергентами у воді залежно від їх хімічної будови, концентрації й умов середовища [4]

Гідрофобні ділянки мембранних білків, які зазвичай вбудовані в мембранний ліпідний бішар, оточуються шарами детергентних молекул, і їхні гідрофільні частини експонуються у водне середовище, що й сприяє утриманню мембранних білків у розчині. Повне видалення детергента може привести до агрегації внаслідок утворення кластерів за рахунок гідрофобних ділянок і в результаті – до преципітації мембранних білків.

Хоч фосфоліпіди можуть використовуватися як детергенти у стимулюючому утворення бішару середовищі, вони формують великі структури, що називаються *везикулами*, які важко ізолювати. Ліозофосфоліпіди утворюють міцели, подібні за розміром до детергентних, проте вони є надто дорогими для широкого використання в білковій біохімії. Тому використання синтетичних детергентів є найзручнішим для виділення мембранних білків.

Розчинення мембран за допомогою детергентів можна розділити на кілька відмінних стадій (рис. 12). За низьких концентрацій детергенти зв'язуються з мембраною, деструктуруючи ліпідний бішар. За вищих концентрацій, коли бішари насичені детергентами, мембрана дезінтегрується з утворенням змішаних міцел, у яких гідрофобні ділянки мембранних білків оточені гідрофобними ланцюгами міцел.

На кінцевих стадіях солюбілізація мембран зумовлює формування змішаних міцел, які складаються з ліпідів і детергентів, та детергентних міцел, що містять білки (зазвичай один білок на міцелу). Наприклад, солюбілізація мембран, які містили родопсин, дигітоніном приводила до утворення комплексів, до складу яких входила одна молекула родопсину на міцелу з 180 молекул дигітоніну.

Інші комбінації міцел, що містять ліпіди й детергенти та комплекси ліпід–білок–детергент, є можливими при використанні проміжних концентрацій детергента. Міцели, що містять комплекси білок–детергент, можна відокремити від інших міцел за їхнім зарядом, розміром і густиною.

Дуже важливим є правильний вибір детергента, оскільки саме він руйнує біомембрану, заміщуючи ліпіди, що оточують ті чи інші білки, і визначає стабільність білка в розчині. Відповідні вимоги до детергентів і правил роботи з ними створюють додаткові проблеми, крім тих, з якими зазвичай стикаються при очищенні білків. Зараз не існує якогось одного детергента або єдиного методу реконструкції, який виявився придатним для всіх мембранних білків.

Класифікація детергентів. На сьогодні існує багато детергентів з різними комбінаціями гідрофобних і гідрофільних груп. Їх класифікація базується на природі групи гідрофільної "голівки". За цією класифікацією їх поділяють на іонні, неіонні та цвітер-іонні детергенти [58]. На рис. 13 і в табл. 5 наведено найуживаніші детергенти і зазначено їхні властивості.

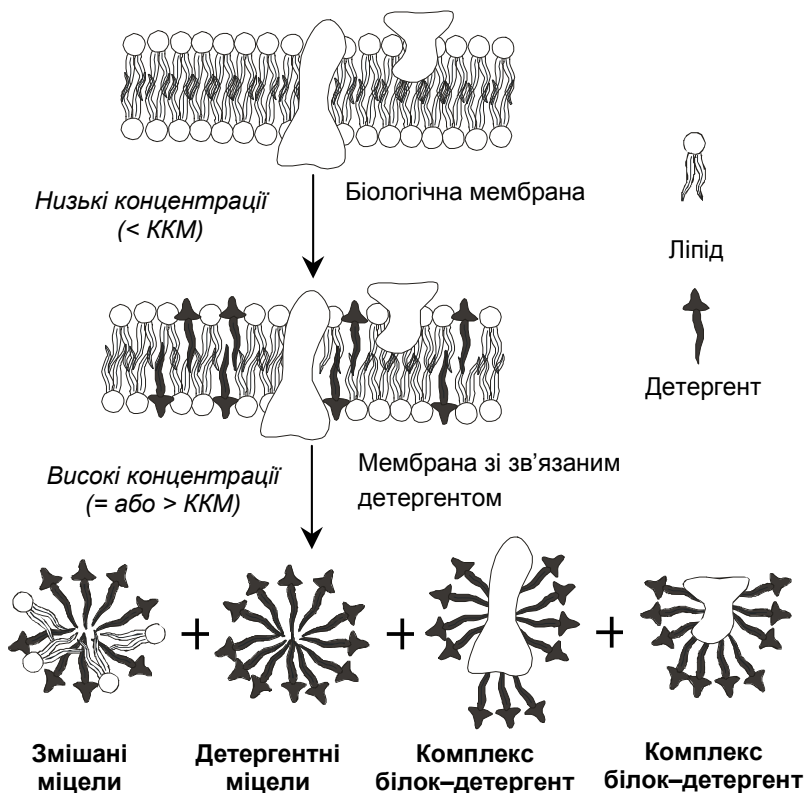
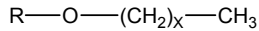


Рис. 12. Стадії солюбілізації біологічної мембрани за допомогою детергентів [58]

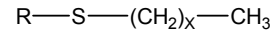
Іонні детергенти містять "голівку", на якій групи формують сітку зарядів. Вони можуть бути позитивнозарядженими (катіонні) або негативнозарядженими (аніонні). До аніонних детергентів належать солі жовчних кислот – холат і дезоксихолат, до катіонних – алкілтриметиламонієві солі, а до цвітер-іонних – CHAPS (3[(3-холамідопропіл)-диметиламоній]-1-пропансульфонат (англ. 3[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulphonate). Наприклад, додецилсульфат натрію (SDS) містить негативно заряджену сульфатну групу і є аніонним детергентом, тоді як цетилтриметил-1-амоній бромід (ЦТАБ) має позитивно заряджену триметиламонієву групу і є катіонним детергентом. Крім цього, іонні детергенти містять вуглеводневий (алкільний) ланцюг (SDS, ЦТАБ) або більш складну жорстку стероїдну структуру (дезоксихолат натрію).



R = глюкоза

x = 8 – *n*-ноніл-β-D-глюкопіранозид

x = 7 – *n*-октил-β-D-глюкопіранозид



R = мальтоза

x = 11 – додецил-β-D-мальтозид

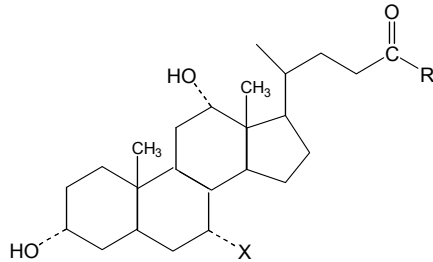
x = 9 – децил-β-D-мальтозид

Алкільні глікозиди

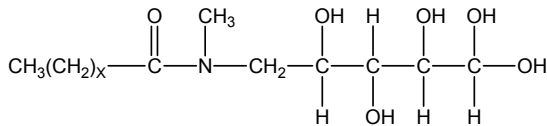
x = H; R = ONa⁺ – дезоксихолат натрію (3α,12α-дигідрокси-5β-холаноат-24)

x = H; R = NH-CH₂-CH₂-SO₃Na⁺ – тауродезоксихолат натрію

x = OH, R = O⁻Na⁺ – холат натрію (3α,7α,12α-тригідрокси-5β-холаноат-24)



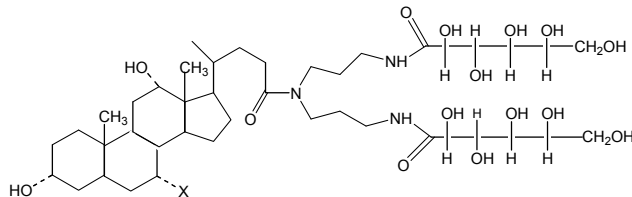
Солі жовчних кислот



x = 8 – MEGA-10

x = 7 – MEGA-9

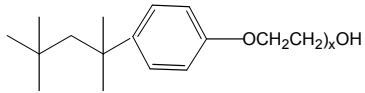
x = 6 – MEGA-8



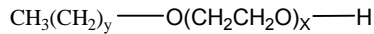
Глюкаміди

x = H – дезокси Big CHAP

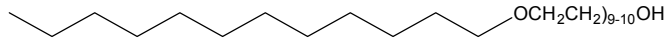
x = OH – Big CHAP



$x = 9-10$ – тритон X-100, NP-40
 (*n*-трет-октил)-феніловий етер поліетиленгліколю, 9–10)
 $x = 7-8$ – відновлений тритон X-114

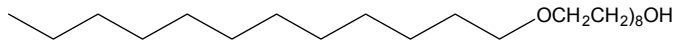


$y = 12, x = 8$ – GENAPOL X-080
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y \text{---} \text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x \text{---} \text{H}, y = 12, x = 10$ – GENAPOL X-100
 $y = 11, x = 10$ – GENAPOL C-100
 $y = 11, x = 23$ – BRIJ 35

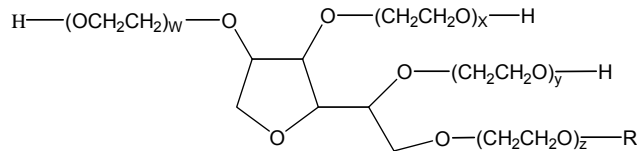


$y = 11, x = 9$ – C₁₂E₉ – THESIT, Луброл PX

(додециловий етер поліетиленгліколю, 9-10)



$y = 11, x = 8$ – C₁₂E₈ (додециловий ефір октаетиленгліколю, Атлас G2127)

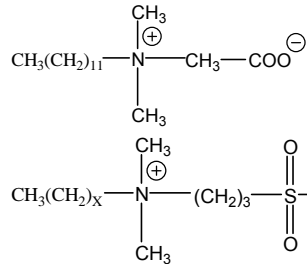


$X = 98, Y = 67, Z = 98$ – PLURONIC F-127
 $R = \text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CO}_2^-$ (laurate) – **TWEEN 20**
 $R = \text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{CO}_2^-$ (oleate) – TWEEN 80

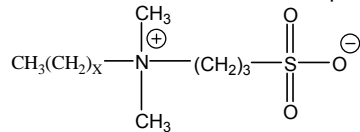
$$W + X + Y + Z = 20$$

Монодисперсні та полідисперсні поліоксидетилені

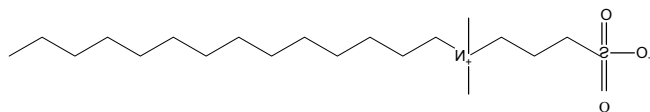
EMPIGEN BB (*n*-додецил-*N,N*-диметилгліцин)



pH ≥ 6

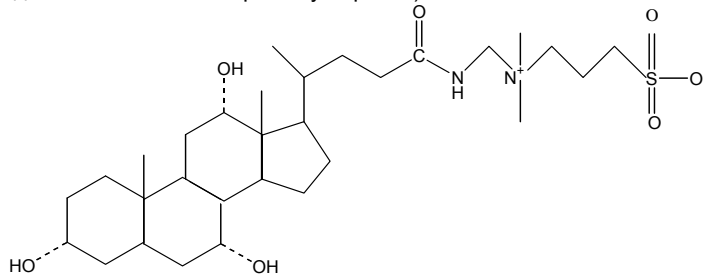


$x = 7$ – Цвітергент 3-08
 $x = 9$ – Цвітергент 3-10
 $x = 11$ – Цвітергент 3-12
 $x = 15$ – Цвітергент 3-16

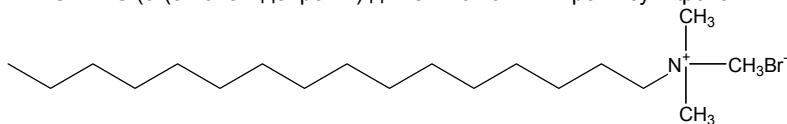


x = 13 – Цвітергент 3-14

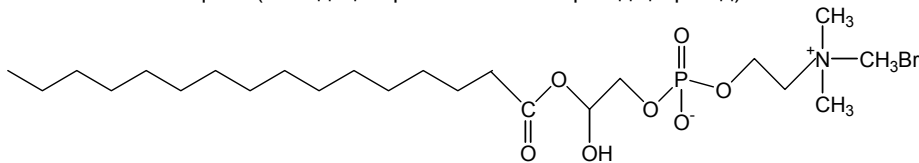
(N-тетрадецил-N,N-диметил-3-амоній-1-пропілсульфонат)



CHAPS (3-(3-холамідопропіл)-диметиламоній-1-пропілсульфонат)



ЦТАБ (гексадецилтриметиламоній бромід цетримід)



Лізофосфатидилхолін (лізолецитін)

Цвітер-іонні детергенти

Рис. 13. Структурні формули та назви детергентів [7; 58]

Таблиця 5. Властивості окремих детергентів [18]

Детергент	ККМ, ммоль/л	Молекулярна маса	Розмір міцели	Агрегаційне число	Питома вага, мл/г
Додецилсульфат натрію	1,33	288	24500	85	0,864
Холат натрію*	3	408	2100	5	0,778
Дезоксихолат натрію*	0,91	392	2300	55	0,771
C ₁₂ E ₈	0,11	538	68000	12	0,973
Тритон X-100**	0,24	628	90000	140	0,908
Твін 80**	0,012	1300	76000	60	0,896
Лаурилдиметамі- ноксид	2,2	229	17000	75	1,112
β-D- октилглюкозид	25	293	8000	27	0,820
β-D- лаурилмальтозид	0,16	510	50000	98	0,820
CHAPS	8	615	6150	10	0,802
Цвітергент 3-12	3,6	335	-	-	0,957

* – Властивості розчинів солей жовчних кислот значною мірою залежать від температури, рН, типу протиіона та іонної сили. Залежно від умов утворюються малі або великі міцели. Дані наведено для таких умов: 0,15 моль/л NaCl, 20 °С, рН 9. За рН на одиницю вище рК_а солі жовчних кислот осаджуються, що може привести до утворення гелів, особливо у присутності дезоксихолату. Значення рК_а для холату дорівнює 5,2, а для дезоксихолату – 6,2.

** – Ці детергенти є полідисперсними сумішами. У таблиці наведено середні значення. Для даних зразків вони, ймовірно, відрізняються.

Між однаково зарядженими полярними групами в детергентних міцелах спостерігається відштовхування. Тому розмір міцел визначається комбінованим ефектом гідрофобного притягання бічних ланцюгів та силою відштовхування іонних груп. У результаті цього нейтралізація заряду груп "голівки" при підвищенні концентрації протилежного іона приводить до утворення міцел більшого розміру. Розмір міцел також збільшується при подовшанні вуглеводневого ланцюга.

В окрему групу дослідники виділяють *солі жовчних кислот*, що є аніонними детергентами, які містять жорсткі стероїдні гідрофобні структури (наприклад, натрієва сіль холієвої та деоксихолієвої кислот). Крім аніонної карбоксильної групи в кінці короткого вуглеводневого ланцюга вони також містять гідроксильні групи на стероїдній структурі, утворюючи таким чином чітко визначену полярну групу "голівки". Солі жовчних кислот поєднуються в малі агрегати, можуть зв'язуватися з таурином або гліцином за кінцевою карбоксильною групою. На відміну від сферичних міцел, утворених алкільними неіонними детергентами, міцели, утворені солями жовчних кислот, формуються завдяки своїй ригідній структурі. Як і для

іонних детергентів, розмір міцел солей жовчних кислот залежить від концентрації протилежно заряджених іонів. Через низьку pK_a (5–6) незв'язаних солей жовчних кислот і слабку розчинність самих жовчних кислот вони є корисними лише за лужних рН.

Разом з тим, pK_a зв'язаних солей жовчних кислот є набагато нижчою, тому вони можуть використовуватися в більш широким діапазоні рН. Дигідроксисолі жовчних кислот і деоксихолат є більш ефективними, ніж тригідроксисолі жовчних кислот при солюбілізації мембран і при дисоціації білок-білкових взаємодій.

На сьогодні широко відомим виробником аніонних детергентів є фірма "Calbiochem", яка пропонує 20 таких сполук: BATS, TOPPS (трет-октилфенілпропансульфонова кислота), BATS (4'-аміно-7-бензамідотаурохолієва кислота – синтетичне похідне таурохолієвої кислоти, що застосовується для солюбілізації глікозилфосфатиділінозитол-якірних мембранних білків). TOPPS має таку саму ароматичну гідрофобну структуру, як і тритон X-100, проте замість неіонних поліоксиетиленових груп, він має іонну сульфонатну групу в гідрофільній "голівці". Цей детергент використовується при ренатурації хімічно або термічно денатурованої ангірази В.

Неіонні детергенти включають такі речовини, як октил- β -D-глюкопіранозид (октилглюкозид) і поліоксиетиленові похідні типу тритону X-100, лубролу PX і твінів. Вони мають незаряджені гідрофільні групи в "голівці", що містять поліоксиетиленові компоненти (BRIJ, тритон) або глікозидні групи (октилглюкозид, додецилмальтозид). Узагалі неіонні детергенти найкраще придатні для руйнування ліпід-ліпідних або ліпід-білкових взаємодій, ніж білок-білкових. Тому вони вважаються неденатуруючими й широко використовуються для виділення мембранних білків у біологічно активній формі. На відміну від іонних детергентів, солі справляють мінімальний вплив на розмір міцел неіонних детергентів. Детергенти з поліоксиетиленовими групами в "голівці" можуть містити алкілполіетиленові етери із загальною формулою $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_xOH$ або фенільне кільце між алкільним ланцюгом та етерним угрупованням. Тритон X-100 та NP-40 належать до останнього класу. Поліоксиетиленовий ланцюг утворює невпорядковане кільце й у подальшому видаляється з гідрофобного кору міцели. Детергенти з вкороченими поліоксиетиленовими ланцюгами утворюють у воді агрегати та в'язкі розчини за кімнатної температури, тоді як довші ланцюги не агрегують взагалі. Детергенти, що містять ароматичні кільця, поглинають в ультрафіолетовій ділянці спектра і тому заважають спектрофотометричному визначенню білків за 280 нм. На сьогодні синтезовано гідрогеновані похідні цих детергентів з відновленими ароматичними кільцями, які виявляють порівняно низьке поглинання за 280 нм. Алкільні глікозиди усе більше використовуються як неіонні детергенти при виділенні мембранних білків. Причиною цього є, по-перше, їхня гомогенність за складом і структурою. По-друге, цілу низку похідних алкільних глікозидів, що містять різні вуглеводневі скелети

(циклічний або нециклічний ланцюг) та полярну вуглеводну структуру, можна легко синтезувати з вихідних форм. По-третє, незначну різницю між фізико-хімічними властивостями алкільних глікозидів із численними алкільними ланцюгами, з'єднаними з глюкозою, мальтозою або цукрозою, покладено в основу селективної солюбілізації мембранних білків.

Цвітер-іонні детергенти є унікальними сполуками, оскільки вони мають властивості як іонних, так і неіонних детергентів. Подібно до неіонних детергентів цвітер-іонні детергенти, включаючи CHAPS та цвітергент серії 3-X, не несуть негативного заряду, їм не притаманна електропровідність та електрофоретична рухливість, і вони не зв'язуються з іонообмінними смолами. Проте, як і іонні детергенти, вони є ефективними для руйнування білок-білкових взаємодій. Такі цвітергенти, як CHAPS є менш денатуруючими, ніж цвітергент серії 3-X, можливо, завдяки жорсткій структурі свого стероїдного кільця.

Емпірично найбільш ефективними є неіонні детергенти (третон X-100, октилглюкозид); солі жовчних кислот (холат, дезоксихолат); цвітер-іонні детергенти (CHAPS, цвітергент), але вибір детергента, найбільш прийнятнього для солюбілізації й очищення певного мембранного ферменту, як і раніше, здійснюється методом проб і помилок.

Крім детергентів, при дослідженні мембранних білків ефективно використовуються також недетергентні сульфобетаїни (НДСБ), які не є детергентами й не здатні утворювати міцели. Ці сполуки мають гідрофільні групи, подібні до тих, що існують у складі цвітер-іонних детергентів, проте їхній гідрофобний ланцюг є значно коротшим. При комбінованому застосуванні їх з традиційними детергентами можна отримати більший вихід мембранних білків. Крім того, вони перешкоджають агрегації під час ренатурації хімічно або термічно денатурованих білків.

Властивості детергентів. Молекули всіх детергентів, як правило, мають дві просторово чітко розділені ділянки: гідрофобну та гідрофільну. В неіонних детергентів розмір полярної ділянки набагато більший, ніж в іонних.

Критична концентрація міцелоутворення (ККМ). Як було зазначено вище, оскільки детергенти є амфифільними молекулами, у водних розчинах вони утворюють міцели. Міцелами – це термодинамічно стійкі колоїдні агрегати, які самодовільно утворюються за певної концентрації амфифілу (ККМ) і за температур, вищих за критичну температуру міцелоутворення. Отже, ККМ можна визначити як найнижчу концентрацію, вище якої мономери кластеризуються в міцели, тобто нижче ККМ амфифіли є диспергованими в мономерній формі. Інакше кажучи, це максимальна досяжна концентрація мономерів. Реально міцелоутворення відбувається у вузькому концентраційному діапазоні. ККМ зменшується з довжиною алкільного ланцюга та збільшується при введенні подвійних зв'язків і точок розгалуження, наявних, наприклад, у солях жовчних кислот. Додавання сечовини, яка порушує структуру води, також викликає збільшення

ККМ. У випадку іонних детергентів є бажаним досягти ККМ, якщо для видалення детергента використовується діаліз.

ККМ прямим і непрямим чином пов'язана з реконструкцією [61]. Концентрація детергента, яка викликає солюбілізацію, залежить від дії тих самих факторів, які впливають на величину ККМ. Непрямий зв'язок виявляється в тому, що детергенти з більш високою ККМ легше видаляються діалізом, ніж детергенти, що мають низьку ККМ.

Для визначення ККМ використовуються три найбільш відомі методи: поверхневий натяг, розсіяння світла та ліофілізація. Поверхневий натяг зменшується з концентрацією детергента та досягає мінімуму близько значень ККМ. Розсіяння світла, як і розчинність гідрофобних барвників, збільшується з концентрацією детергента. За значеннями ККМ, концентрації детергента та агрегаційного числа можна вирахувати концентрацію міцел у молях на літр за такою формулою:

$$[\text{міцели}] = (C_s - \text{ККМ})/N,$$

де C_s – молярна концентрація детергента; N – головне агрегаційне число [58]. Наприклад, розчин, який містить CHAPS у концентрації 35 ммоль/л ($M_r = 630,9$) у фосфатному буфері, матиме $(35 - 8)/11 = 2,45$ ммоль/л міцел.

За загальною структурною організацією детергенти поділяють на типи А і В. Детергенти типу А (наприклад, октилглюкозид, саркозил, BRIJ, тритон серій X та N, луброл) мають гідрофільну "голівку" та гнучкий гідрофобний "хвіст" [7]. Вони утворюють міцели з молекулярною масою 20–90 кДа, в які вбудовані гідрофобні ділянки мембранних білків. ККМ для детергентів типу А, в який "голівка" формується з неіонних або цвітеріонних груп, є дуже малою (<1 ммоль/л). Нижче цих концентрацій детергенти існують у розчині у вигляді мономерів. Більш високі значення ККМ для іонних детергентів зумовлено, можливо, взаємним відштовхуванням іонних груп, які формують "голівки", оскільки при збільшенні іонної сили середовища знижується ККМ і збільшується молекулярна маса міцел. Детергенти типу В (наприклад, солі жовчних кислот) утворюють міцели з низькою молекулярною масою й для них характерні високі значення ККМ. Ці детергенти, взаємодіючи з мембранними білками, утворюють моношар, що вкриває гідрофобні ділянки цих молекул.

Крафт-точка (kraft point). За низьких температур детергенти залишаються переважно в нерозчинному кристалічному стані й перебувають у рівновазі з маленькими кількостями розчиненого мономера. При підвищенні температури все більше мономерів детергента переходять у розчин, доки концентрація детергента не досягне ККМ. У цій точці переважає міцелярна форма. Температура, за якої концентрація мономера досягає ККМ, називається *критичною міцелярною температурою (КМТ)*. Температура, за якої всі три фази – кристалічна, міцелярна та мономерна – існують у рівновазі, називається *крафт-точкою* (рис. 14). За цієї температури розчин детергента стає прозорим, і його концентрація досягає значень ККМ. Для більшості детергентів крафт-точка є ідентичною ККМ.

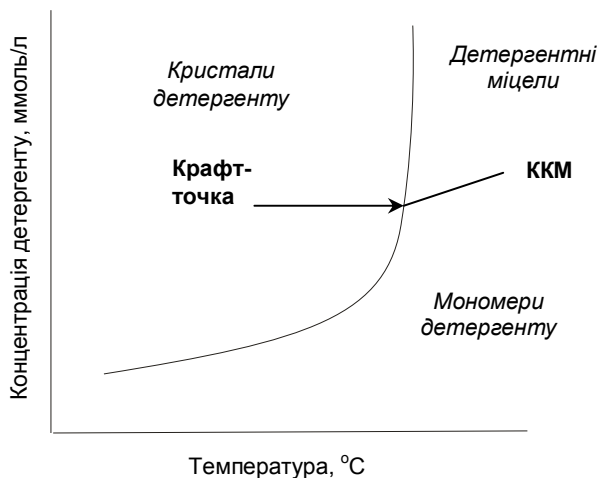


Рис. 14. Графік залежності температура – фазовий стан для розчинів детергентів [58]

Точка помутніння (cloud point). За певної температури вище КМТ неіонні детергенти утворюють помутніння (cloudy) і підлягають фазовому розділенню з утворенням детергентзбагачених шарів і водних шарів. Ця температура називається *точкою помутніння*. Розділення фаз, імовірно, відбувається внаслідок зменшення гідратації груп "голівки". Наприклад, точка помутніння для тритону X-114 становить близько 22 °С. Тому тритон X-114 слід використовувати холодним. Спочатку мембрани солюбілізують за 0°С, потім розчин нагрівають до 30°С для розділення фаз. Це дозволяє перевести мембранні білки у детергентну фазу, після чого вони можуть бути відокремленими центрифугуванням.

Агрегаційне число. Це кількість мономерних молекул детергента, які входять до складу одинарної міцели. Агрегаційне число можна вирахувати діленням молекулярної маси міцели на молекулярну масу мономера. Молекулярну масу міцел може визначити за допомогою цілої низки методів, зокрема гель-фільтрацією, розсіянням світла, седиментаційної рівноваги та розсіяння рентгенівських променів. Міцели, утворені солями жовчних кислот, мають низьке агрегаційне число, тоді як міцели, утворені тритоном, мають вище агрегаційне число. Як і розмір міцел, агрегаційне число також залежить від іонної сили.

$$\frac{\text{молекулярна маса міцел}}{\text{молекулярна маса мономера}} = \text{агрегаційне число.}$$

Гідрофільно-ліпофільний баланс (ГЛБ). Цей параметр є мірою гідрофобних властивостей детергента: чим більшим є ГЛБ, тим більш гідрофіль-

льним є детергент [58]. Існує певна кореляція між значенням ГЛБ детергента та його здатністю солюбілізувати мембранні білки. ГЛБ змінюється від 1 до 20, використовується при одержанні сурфактантів як міра відносної гідрофобності. Отримані деякі кореляції, з яких випливає, що значення ГЛБ детергента може використовуватися для передбачення його поведінки в біологічних системах. Можна стверджувати, що детергенти зі значенням ГЛБ у діапазоні від 12,5 до 14,5 є найефективнішими розчинниками інтегральних мембранних білків. Детергенти з ГЛБ нижче 1 або вище 20 є придатними для солюбілізації периферичних білків. Також, чим нижчим є ГЛБ, тим більш гідрофобним є детергент і тим легше його можна видалити із суспензії за допомогою гідрофобної хроматографії.

Підсумовуючи розглянуті вище властивості детергентів, можна зробити висновок, що дія детергента залежить від таких факторів: концентрації детергента, присутності органічних домішок, іонної сили, чистоти препарату, довжини алкільного ланцюга, температури та рН.

Критерії солюбілізації. У перших роботах із солюбілізації мембранних білків для отримання водних розчинів амфіфільних білків видаляли гідрофобну частину молекули протеолізом і досліджували розчинний гідрофільний фрагмент, який мав біологічну активність. Таких підхід із розділенням мембранного білка на домени є особливо цінним, коли він використовується паралельно з солюбілізацією за допомогою детергентів, яка дає змогу отримати інтактні молекули [7].

Для виділення деяких трансмембранних білків використовуються органічні розчинники, наприклад, бутанол, проте їх застосування не завжди є оптимальним. Так, при солюбілізації за допомогою бутанолу лужної фосфатази, можливо, відбувається активація ендогенної фосфоліпази, що сприяє екстракції фосфатази у водний розчин.

Перший етап очищення того чи іншого мембранного білка зазвичай включає вибір придатного біологічного джерела та виділення мембранної фракції, збагаченої на даний білок. На наступному етапі проводять солюбілізацію детергентами. Із фізико-хімічного погляду солюбілізація – це "процес отримання термодинамічно стійкого ізотропного розчину речовини, зазвичай нерозчинної у даному розчиннику, шляхом уведення добавок амфіфільного компонента або компонентів". Таке визначення є застосовним відносно солюбілізації й реконструкції біологічних мембран, які складаються з ліпідів і білків, нерозчинних у воді. Зручними амфіфілами в даному разі є детергенти. При додаванні до біологічної мембрани детергент вбудовується в неї до досягнення точки насичення, після чого мембрана починає розпадатися на змішані міцели типу детергент – ліпід – білок.

Найчастіше про солюбілізацію судять за появою білка або відповідної біологічної активності в надосадовій рідині після високошвидкісного центрифугування, зазвичай за прискорення 105 000 g упродовж 1 год. Більшість мембран у таких умовах осаджуються, і таким чином можна відокремити солюбілізований матеріал від несолубілізованого.

Існують також інші критерії солюбілізації. Гель-фільтрація на носіях з великим розміром пор надає можливість відокремити нерозчинний (або агрегований) матеріал, який виходить у вільному об'ємі колонки, від солюбілізованого, який затримується в гелі.

У принципі, при солюбілізації можна було б легко відрізнити солюбілізований матеріал від несолубілізованого за допомогою методу електронної мікроскопії. Проте звичайні методи підготовки препарату для мікроскопіювання можуть спричинити розведення детергента в результаті часткової реконструкції мембран.

При солюбілізації мутність розчину значно зменшується, що можна встановити за зменшенням розсіяння світла досліджуваним зразком або за збільшенням його світлопродукції.

Дуже перспективним для контролю за повнотою солюбілізації за допомогою детергентів є, ймовірно, метод ^{31}P -ЯМР. Про хід солюбілізації можна судити за перетворенням широкого ЯМР-сигналу, характерного для фосфоліпідів у складі мембран, на вузький пік, який утворюють фосфоліпіди в міцелах.

При солюбілізації детергентами постає питання про можливість вибіркового вивільнення з мембрани саме тих компонентів, які цікавлять дослідника. Тому будь-який новий детергент бажано перевірити на можливість вибіркової екстракції певних мембранних компонентів. Так, за екстракцією білків можна стежити, визначаючи сумарний білок, а також вимірюючи характерну для цих білків ферментативну або лігандзв'язуючу активність.

Вибір детергента. Протягом останніх двох десятиріч з'явилося дуже багато детергентів, придатних для очищення інтегральних мембранних білків. Потрібно намагатися знайти такий детергент, який не порушував би вторинної й третинної структури мембранних білків, а лише заміщував би більшість мембранних ліпідів, що контактують з гідрофобними ділянками білкової молекули [81]. Успіх солюбілізації, очищення та реконструкції найчастіше залежить саме від вибору придатного детергента. Жоден з них не є універсальним. Це зумовлено трьома обставинами: 1) сильними відмінностями в дії детергентів навіть на одні й ті самі мембранні білки; 2) відсутністю єдиної стратегії солюбілізації та реконструкції; 3) складним характером взаємодій між молекулами білків, ліпідів і детергентів, які мають дуже різну хімічну будову. Тому вибір детергента для солюбілізації та реконструкції значною мірою базується на емпіричних уявленнях, а не наукових принципах.

Існують певні вимоги до детергентів, які застосовуються для солюбілізації та реконструкції. У цілому детергент має солюбілізувати, але не денатурувати білок і повинен бути доступним у чистому вигляді; бажано, щоб він також був недорогим. Для добору оптимального детергента для солюбілізації білка доцільно приготувати потрібну мембранну фракцію, в якій міститься цей білок, і зберігати її розділеною на кілька порцій за $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Тоді всі експерименти можна буде провести на одному препараті мембран.

Емпірично найефективнішими є: 1) неіонні детергенти (третон Х-100, октилглюкозид); 2) солі жовчних кислот (холат, дезоксихолат); 3) цвітер-іонні детергенти (CHAPS, цвітергент). Але вибір детергента, найбільш придатного для солюбілізації й очищення певного мембранного ферменту, як і раніше, здійснюється методом проб і помилок.

Фактори, які слід урахувати при використанні детергентів. Кінцевою метою солюбілізації є вбудовування білка в детергентну мицелу; подальша стратегія очищення полягає в розділенні таких білково-детергентних комплексів.

Важливою проблемою є добір оптимальних умов солюбілізації досліджуваного білка. Детергенти, які денатурують білки (наприклад, ДСН), не підходять для вирішення такої делікатного завдання. Разом з тим, багато детергентів недостатньо ефективно руйнують мембрани й утворюють білоквісні змішані міцели. Такі детергенти можуть бути або занадто гідрофобними, або занадто гідрофільними для ефективного змішування з мембранними ліпідами і (за досить високої концентрації) для перетворення бішару у глобулярні змішані міцели. Спочатку сподівалися, що вибір необхідного детергента вдасться систематизувати за допомогою гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ) [16]. Проте згодом з'ясувалося, що пошук оптимальних детергентів для певного мембранного білка вимагає врахування багатьох факторів і завжди має супроводжуватися емпіричною перевіркою. Серед цих факторів можна назвати такі:

1. *Максимальна солюбілізація досліджуваного білка.* Критерієм є перехід білка в супернатант після центрифугування, під час якого відбувається осадження мембрани (наприклад, після центрифугування за 100 000 г упродовж 1 год.).

2. *Солюбілізація білка в потрібній формі.* Зазвичай йдеться про збереження його ферментативної активності, але іноді використовуються певні спектральні характеристики або присутність конкретних білкових асоціатів. Крім того, необхідною умовою є стабільність білка після солюбілізації. У деяких випадках для підтримання біохімічної активності разом з детергентом додають екзогенні фосфоліпіди. Як приклад можна навести одержання лактозопермеази *E. coli* та білка натрієвого каналу. Іноді для стабілізації білка після солюбілізації додають гліцерол чи інший поліол (у випадку розчинних білків). Доцільно використовувати також інгібітори протеаз і проводити солюбілізацію в умовах, що зводять до мінімуму ймовірність їх протеолітичного розщеплення.

3. *Можливість використання детергента в даній методиці.* Необхідно насамперед урахувати заряд детергента (іонообмінна хроматографія), поведінку за даного значення рН (так, солі жовчних кислот часто випадають в осад за рН < 8), ККМ і розмір мицел детергента. Останні властивості є особливо важливими. Детергенти з низкою ККМ, що утворюють великі міцели, не відокремлюються при діалізі чи ультрафільтрації через занадто низьку концентрацію мономерів детергента (а саме

вони є досить малими для проходження через пори мембран). З практичного погляду це означає, що, якщо концентрувати білок за допомогою ультрафільтрації, зростатиме й концентрація детергента з низкою ККМ, а це може привести до денатурації білка. Із цієї причини багато дослідників воліють використовувати детергенти з високими ККМ, наприклад, октилглюкозид, солі жовчних кислот чи більш сучасні цвітер-іонні детергенти. Дуже цінними є полістиренові смоли, такі як біобідс SM-2. Вони вибірково зв'язуються з детергентами типу тритон X-100, видаляють їх з розчину й дозволяють обійтися взагалі без діалізу. Ще один фактор, який необхідно враховувати, – це поглинання світла детергентом. Деякі детергенти, наприклад, тритон X-100, поглинають у ближній УФ-ділянці, що унеможлиблює визначення концентрації білка за виміром оптичної густини за довжини хвилі 280 нм.

З урахуванням усіх цих факторів стає зрозуміло, чому в багатьох випадках при виділенні інтегральних мембранних білків доводиться використовувати різні детергенти. Наприклад, для солюбілізації можна застосовувати тритон X-100, а розділення за допомогою ДЕАЕ-целюлози краще проводити у присутності октилглюкозиду. Детергенти можна змінювати на стадії хроматографії, під час центрифугування у градієнті густини, а в деяких випадках – за допомогою діалізу. Варто мати на увазі, що детергент, непридатний для солюбілізації певного білка, може бути дуже ефективним для збереження білка в розчині після заміни детергента. Очищення майже завжди варто проводити за надлишку детергента в розчині, інакше рівновага буде зміщена в бік агрегації мембранних білків, а не в бік утворення білково-детергентних комплексів. У деяких випадках подібна агрегація може бути навіть бажаною, й остання стадія очищення може полягати у видаленні детергента (наприклад, при очищенні глікофору, цитохрому b5, цитохром с-оксидази). Але, як правило, за нестачі детергента відбуваються незворотне осадження і втрата білка.

Необхідність підтримання концентрації детергента на певному рівні (зазвичай поблизу ККМ чи вище) створює додаткові ускладнення, крім тих, з якими можуть стикатися при очищенні білків, наприклад, труднощі концентрування білка за допомогою ультрафільтрації. Проблеми виникають і при використанні стандартного методу висолювання за високої концентрації сульфату амонію: у багатьох випадках білок осаджується в комплексі з детергентом і ліпідом. Оскільки сольовий розчин має високу густину, а детергент в агрегаті – відносно низьку, то при центрифугуванні преципітат залишатиметься на поверхні. Важливо пам'ятати, що очищенню піддаються білково-детергентні комплекси нерідко зі значною кількістю зв'язаного фосфоліпіду. Це відбивається на якості поділу при хроматографії, а також на результатах характеристики кінцевого продукту.

Видалення детергента. При солюбілізації реконструкції мембранних білків для їх наступної фізико-хімічної та хімічної характеристики необхідно позбутися надлишку детергента. Методи видалення детергентів

базуються на їхніх властивостях: гідрофобності, ККМ, агрегаційному числі та заряді.

Гідрофобна адсорбція. Цей метод базується на здатності детергентів зв'язуватися з гідрофобними смолами. Зокрема, фірмою "Calbiochem" створено гідрофобну нерозчинну смолу "Calbiosorb™ Adsorbent", яка використовується для видалення надлишку детергента [58]. Розчин, який містить детергент, змішують з певною кількістю сорбенту, і суміш інкубують за кімнатної температури. Сорбент із зв'язаним детергентом можна видалити центрифугуванням або гель-фільтрацією. Даний метод є придатним для більшості детергентів. Якщо абсорбція білка на смолі є небажаною, його можна видалити діалізом, проте, така процедура є досить тривалою.

Діаліз. Найчастіше детергент видаляють за допомогою діалізу [18]. Коли розчини детергентів розводять до концентрацій нижче ККМ, міцели диспергуються на мономери. Розмір мономерів є меншим, ніж їхній розмір у міцелах, і тому їх легше відокремити діалізом. Оскільки великі розведення на практиці майже не використовуються, міцели можна диспергувати за допомогою інших підходів, наприклад, при додаванні солей жовчних кислот. Найчастіше діаліз використовується для видалення детергентів з високою ККМ.

Міцелярний розчин наливають у целофановий мішечок і діалізують проти великого об'єму буфера, що не містить детергента (зазвичай на холод). Як правило, використовують 200-кратний надлишок буфера відносно об'єму діалізованого розчину з трьома чи чотирма змінами протягом кількох діб. Перевага цього методу полягає в його простоті: можна одночасно діалізувати кілька зразків (які містять, наприклад, різні ліпіди), при цьому не потрібно ні спеціального обладнання, ні особливого контролю за ходом діалізу. Недоліком цього методу є те, що видалення детергента потребує багато часу. Крім того, що це створює певні незручності, тривалий контакт з детергентом може привести до ушкодження деяких мембранних білків. Очевидно, створення детергент-білкових міцел неминуче відбувається навіть за надлишку ліпіду. Якщо з якихось причин інгібітори протеолітичних ферментів не було додано при солюбілізації чи очищенні білка, то може виявитися корисним їх додавання на стадії видалення детергента.

Швидкість видалення детергента залежить від багатьох факторів, але в будь-якому разі слід прагнути до того, щоб залишковий вміст детергента не перевищував 0,02 % (в/о) чи був у 100 разів нижчим первинного рівня.

Гель-хроматографія переважно застосовується для розділення за розміром білково-детергентних, детергентно-ліпідних і гомогенних детергентних міцел [58]. У міру проходження суміші через колонку концентрація детергента в ній знижується, завдяки чому формуються ліпідно-білкові везикули. У більшості випадків білково-детергентні міцели елюються у вільному об'ємі. Елюючий буфер може містити детергент у концентрації нижче ККМ для запобігання агрегації та преципітації білка. Під час гель-

хроматографії білки розділяються за розміром. Тому для отримання точних результатів параметри, які впливають на розмір міцел (іонна сила, рН, температура), мають бути незмінними в усіх експериментах.

Перевагою цього методу реконструкції є швидкість, однак він мало придатний у разі великої кількості зразків. Крім того, видалення детергента гель-фільтрацією приводить до більш широкого розподілу частинок за розміром, ніж у разі діалізу.

Іонообмінна хроматографія. У даному методі використовується різниця зарядів між білково-детергентними та вільними від білка детергентними міцелами. При використанні неіонних і цвітер-іонних детергентів умови можуть змінюватися, оскільки білокмісні міцели адсорбуються на іонообмінній смолі, а вільні від білка міцели проходять крізь колонку. Адсорбований білок відмивається буфером, що не містить детергента, та елююється буфером із зміненими іонною силою або рН. Навпаки, білок можна елюювати іонним детергентом, заміщуючи неіонний детергент.

Видалення ліпідів з мембранних препаратів при солюбілізації. Солюбілізація мембран детергентом приводить до утворення змішаних міцел, до складу яких входять як фосфоліпіди, так і детергент. Більшість інтегральних білків (разом з іншими білками або без них) містяться в солюбілізаті у вигляді комплексів, що мають мономолекулярну оболонку з детергента. Ці комплекси можуть утримувати невелику кількість фосфоліпідів. Часто ці ліпіди видаляються при наступному очищенні, але в деяких випадках у разі особливо міцного зв'язування ліпідів для їх видалення може знадобитися екстракція органічними розчинниками або денатурація білка за допомогою SDS чи органічних розчинників.

Для солюбілізації білків використовуються такі органічні розчинники, як хлороформ, суміш хлороформу з метанолом (а також з етанолом або бутанолом), 1-бутанол, суміш діетилового етеру з етанолом (3 : 1, о/о). Білки, що солюбілізуються за цих умов, часто належать до класу протео-ліпідів. Вони є дуже гідрофобними й мають слабо виражену амфіфільність; у більшості мембран такі білки містяться лише в малих кількостях. Наприклад, такими білками є ДЦК-зв'язуючий білок АТФ-синтезного комплексу й протеоліпідні білки мієліну. Усі вони є розчинними в суміші хлороформу з метанолом (2 : 1, о/о). При використанні суміші хлороформу з метанолом і водним буфером (8 : 3 : 4, о/о) більшість мембранних білків утворює осад на межі розділу водної й органічної фаз, а всі протео-ліпіди переходять у шар органічного розчинника. У водній фазі виявляються сильно глікозильовані компоненти мембран, наприклад, глікофорин і гліколіпіди. Змінюючи співвідношення хлороформ / метанол, можна до певної міри варіювати склад екстрагованих білків.

Екстраговані білки легко виділити, видаляючи органічний розчинник на роторному випарнику, а в деяких випадках їх вдається осадити, додаючи 10–20 об'ємів холодного ацетону, 5–10 об'ємів холодного діетилового етеру

або суміш діетилового етеру й етанолу різного складу (від 1 : 1 до 3 : 1, о/о). Таким самим чином виділяють білки з детергентних розчинів.

Запропоновано також ще дві системи розчинників, які дозволяють отримати хоч і в денатурованому стані, але в розчинній формі майже всі інтегральні білки (а фактично – майже всі водорозчинні білки). Перша із цих систем – суміш мурашиної кислоти з етанолом (3 : 7 або 1 : 2, о/о) – використовувалась для дослідження бактеріородопсину й родопсину. Вона є найбільш придатною для білків, що не містять зв'язаних ліпідів або детергентів. Друга система – мурашина кислота, оцтова кислота, хлороформ та етанол (1 : 1 : 2 : 1, о/о) – розчиняє більшість мембранних білків; ще однією її перевагою є те, що при цьому видаляються всі фосфоліпіди і не відбуваються агрегація білка й самоасоціація ліпиду, що значно полегшує наступне фракціонування. Остання система розчинників є особливо корисною при солюбілізації інтактних мембран. Її краще додавати до густого осаду мембран, що містить лише невелику кількість вологи, яка легко переходить у розчинник.

Фактори, що впливають на стабільність солюбілізованих мембранних білків. *Співвідношення ліпід – детергент – білок.* У більшості випадків перед дослідником постає завдання досягти максимальної солюбілізації білка й зберегти при цьому його функціональну активність. Найефективніший шлях при цьому полягає в тому, щоб вивчити процес солюбілізації в широкому діапазоні співвідношень детергент – ліпід, такі експерименти слід розглядати як необхідний етап будь-якої роботи із солюбілізації й реконструкції мембран. Звичайно, легше виміряти концентрацію білка, ніж ліпиду, тому в літературі найчастіше вказують співвідношення детергент – білок. Оскільки ступінь солюбілізації залежить як від концентрації ліпиду, так і від концентрації детергента в міцелярному стані, було б корисним увести якийсь параметр, що характеризував би ефективну концентрацію детергента:

$$\rho = \frac{[\text{Детергент}] - \text{ККМ}_{\text{еф}}}{[\text{Фосфоліпід}]},$$

де $\text{ККМ}_{\text{еф}}$ означає ККМ, виміряну за даних експериментальних умов. Уведення $\text{ККМ}_{\text{еф}}$ замість ККМ пояснюється тим, що остання часто знижується у присутності ліпідів і білків, однак на практиці найчастіше беруть значення ККМ з довідників. За допомогою параметра ρ намагаються виміряти мольне співвідношення детергента, який міститься в міцелярному стані, до використаного фосфоліпиду.

Проте співвідношення ліпід – детергент – білок під час процесу солюбілізації білка залежить не тільки від ρ , оскільки даний параметр не враховує специфіки ліпід-детергентних взаємодій.

Вплив ліпідів на стабільність білків. Відомо, що повне видалення ліпідів з біологічних мембран супроводжується повною інактивацією мембранних білків навіть у присутності детергентів. Іноді повне видалення ліпідів в умовах солюбілізації приводить до агрегації та осадження білків.

Важливість ліпідів для стабілізації білків зумовлює деякі практичні заходи, які можна здійснити, щоб звести до мінімуму денатурацію. Найпростіші з них пов'язані з урахуванням властивостей використаних детергентів. Наприклад, деліпідизуючу активність деяких детергентів можна знизити, змінюючи такі параметри, як температура, іонна сила й рН. Ще один шлях – просте зменшення концентрації детергента, проте це може вплинути на ефективність солюбілізації.

Деліпідизація білків, яка має місце під час їх очищення, іноді стає серйозною проблемою, і для її розв'язання можна додавати ліпіди в усі елюючі розчини. При додаванні "захисних" ліпідів солюбілізацію можна проводити й за таких концентрацій детергента, які б за інших умов викликали денатурацію. Імовірно, "захисні" ліпіди знижують фактор p . Наприклад, ацетилхоліновий рецептор був успішно реконструйований при використанні октилглюкозиду разом з нативними ліпідами ската *Torpedo*.

У зв'язку із цим перспективним є застосування CHAPS, холату та дигітоніну внаслідок здатності цих стероїдних похідних замінювати холестерол (ліпід, який стабілізує мембранні білки).

Вплив лігандів на стабілізацію функціональної активності білків. Особливістю багатьох мембранних білків є те, що вони можуть перебувати в різних конформаційних станах, які характеризуються різною спорідненістю з певними лігандами. Прикладами таких білків є рецептори, іонні канали, ферменти. Перехід між конформаційними станами часто пов'язаний із змінами ліпідного оточення, і солюбілізація може виявитися сприятливою для одного стану на шкоду іншому. Часто детергенти незворотно змінюють характер спорідненості на користь деякого виродженого стану, який виникає внаслідок денатурації, зумовленої видаленням ліпідів. У більшості випадків денатурації можна запобігти, включаючи до солюбілізованих сумішей ліганди та субстрати. Ці ліганди, ймовірно, фіксують білок у стабільному конформаційному стані. Наприклад, експерименти, проведені з β -адренергічним рецептором, показують, що саме агоністи, на відміну від антагоністів, справляють захисний вплив на білок під час солюбілізації дезоксихолатом. Подібна стабілізація спостерігалась при реконструкції АТФаз за рахунок включення АТФ до інкубаційного середовища та сукцинатдегідрогенази за рахунок додавання сукцинату.

Методи солюбілізації мембранних білків за допомогою детергентів. Для солюбілізації білків мембран за допомогою детергентів застосовуються, зокрема, такі методичні підходи.

Седиментація за високих прискорень (g). У цьому методі мембрани інкубують з детергентом упродовж 30 хв, центрифугують за 100 000 g, визначають активність і підсумовують вміст білка в супернатанті та вихідному невідцентрифугованому зразку. При цьому визначають вихід білка з мембран, ресуспендованих до кінцевої концентрації білка 5 мг/мл, під дією детергента в концентрації 0,2–0,3 % (в/о) за кімнатної температури й за 4 °С. Якщо при додаванні детергента відбувається інактивація біл-

ків, то при солюбілізації використовують стабілізуючі агенти (наприклад, гліцерол), відновлюючі та хелатуючі речовини, інгібітори протеаз.

Фракціонування за розмірами. Якщо даний білок не осаджується після центрифугування за високих прискорень, ще не можна стверджувати про його повну солюбілізацію. У цьому випадку слід визначити його розмір за допомогою електрофорезу в ПААГ або при гель-фільтрації. Придатним сорбентом для гель-фільтрації є сефароза 6В, для якої граничне значення маси частинок становить $\sim 10^3$ кДа. Молекулярну масу солюбілізованих білків можна оцінити, порівнюючи їх R_f зі значенням цього параметра для стандартних білків при гель-фільтрації та електрофорезі в ПААГ.

Солюбілізація в детергентах сильно відбивається на гідрофобних взаємодіях мембранних білків з ліпідами та іншими білками, тоді як вплив детергента на гідрофільні взаємодії є малоімовірним.

Розділення периферичних та інтегральних білків. При виділенні периферичних білків залежно від завдання, яке постає перед дослідником, мембрана може піддаватися м'якій і жорсткій обробці. За м'яких умов обробки використовують як розчини з низькою іонною силою (наприклад, 0,1–1 ммоль/л ЕДТА, який видаляє двовалентні катіони), так і буфери з високою іонною силою, які містять NaCl та KCl у концентрації більш, ніж 1 моль/л. рН середовища може змінюватися в межах від 6,0 до 8,0. За таких умов незворотна денатурація інтегральних і периферичних білків є малоімовірною.

При більш жорсткій обробці з мембран можна видалити значні кількості білка (>50 % від його загального вмісту в мембранах), але, разом з тим, така обробка приводить до денатурації, що є в багатьох випадках незворотною. Наприклад, мембрани може бути оброблено 6 моль/л гуанідинхлоридом, 8 моль/л сечовиною, 1 ммоль/л *n*-хлормеркурілбензоатом, розведеними кислотами (рН 2,0–3,0) або лугами (рН 9,5–11,0). У кислому середовищі іноді спостерігається осадження солюбілізованих білків, і тому найчастіше використовують лужну обробку.

При виділенні інтегральних білків також використовуються детергенти та хаотропні агенти. Проте при такій обробці можуть вивільнюватися або активуватися протеази. Тому на цій стадії доводиться додавати інгібітори протеаз, навіть якщо вони вже були введені на попередній стадії виділення мембран. Існують різні складні суміші інгібіторів, які можна застосовувати залежно від чутливості системи до дії протеолітичних ферментів. Дуже корисним, але не універсальним агентом є інгібітор серинових протеїназ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ). Цей реагент додають у концентрації 100 ммоль/л в ізопропанолі або етанолі й додають до інкубаційного середовища до концентрації 100 мкмоль/л. Для інгібування SH-протеаз може виявитися корисним тетратіонат натрію в концентрації 10 ммоль/л.

Своєрідний, іноді дуже корисний підхід до розділення інтегральних і периферичних білків базується на їх розподіленні у двофазній системі.

Цей метод є найбільш успішним, коли застосовують тритон X-114. Метод базується на високишвидкісному центрифугуванні мембранного препарату в розчині з тритоном X-114 на градієнті густини сахарози. У даному методі використовуються незвичайні властивості детергента, який за 0 °С є розчинним у водному буфері, а вище 20 °С виділяється у вигляді окремої фази. При цьому гідрофільні (тобто периферичні) білки потрапляють у водну фазу, а гідрофобні – опиняються в детергентній фазі. Як нерідко буває при використанні детергентів, досліджуваний білок може виявитися нерозчинним, ненативним і неактивним у тритоні X-114, і це слід з'ясувати із самого початку. Інтегральні білки з підвищеною гідрофільністю (наприклад, білки, що мають один трансмембранний поліпептидний сегмент і/або містять значні кількості ковалентно зв'язаних вуглеводів) можуть потрапити у водну фазу внаслідок самоасоціації або зв'язування детергента, частина якого завжди присутня у водній фазі.

Керівні принципи при роботі з детергентами. Сьогодні існує велика кількість детергентів, і тому вибір оптимального для певного білка може бути ускладненим. Мембранні білки можна солюбілізувати в супернатанті після центрифугування лізату або гомогенату за 100 000 g упродовж 1 год. У більшості випадків важливо, щоб після солюбілізації детергентом у супернатанті зберігалася біологічна активність білка. У зв'язку із цим придатним детергентом є той, що дозволяє отримати максимальну кількість біологічно активного білка в супернатанті. При роботі з детергентами необхідно враховувати такі моменти [58]:

1. Насамперед доцільним є проведення аналізу літератури, зокрема, даних про детергенти, які раніше використовувалися для виділення та характеристики білків зі схожими ензимологічними характеристиками.

2. Слід проаналізувати інформацію щодо розчинності детергента за певної температури під час експерименту. Наприклад, цвітергент 3–14 є нерозчинним у воді за 4 °С, тоді як тритон X-114 підлягає фазовому розділенню за кімнатної температури.

3. Необхідно ретельно обрати метод видалення детергента. Якщо використовується діаліз, найліпше застосовувати детергент з високою ККМ. Навпаки, для іонообмінної хроматографії кращими є неіонні та цвітер-іонні детергенти.

4. Збереження біологічної або ферментативної активності можна досягти за допомогою використання кількох детергентів, що дозволить навіть підсилити активність досліджуваного білка. Для деяких білків їхня біологічна активність зберігається при використанні широкого діапазону концентрацій детергента. За концентрацій нижче цього діапазону білок не солюбілізується, а вище – інактивується.

5. Оскільки тритон X-100 містить ароматичне кільце, яке поглинає світло з максимумом на ділянці спектра 260–280 нм, слід уникати цього детергента, якщо процедура потребує вимірювання концентрації білка за поглинанням в УФ-зоні спектра. Подібно до цього неіонні детергенти є

непридатними для розділення білків ізоелектричним фокусуванням. Під час гель-фільтрації оптимально обирати детергенти з малим агрегаційним числом.

6. Краще застосовувати детергенти з максимальним ступенем чистоти, оскільки деякі, наприклад, тритон X-100, можуть містити пероксиди та інші домішки.

7. Більш ефективними є нетоксичні детергенти. Наприклад, серцевий глікозид дигітонін може використовуватись лише в окремих випадках.

8. Для виділення індивідуальних білків ефективними є лише певні детергенти. Наприклад, детергент Empigen BB є найліпшим для солюбілізації кератинів, оскільки він запобігає вияву їх імуногенності. *n*-Додецил- β -D-мальтозид може бути детергентом при виділенні цитохромоксидази. Отже, для визначення найбільш оптимального детергента найчастіше використовується метод проб і помилок.

Підсумовуючи вищесказане, слід зазначити, що, незважаючи на великі успіхи, досягнуті в мембранології, в галузі солюбілізації та реконструкції мембранних білків і досі відсутній загальний принцип. На сьогодні неможливо рекомендувати якийсь універсальний детергент для солюбілізації будь-яких мембранних білків, і не існує методики реконструкції, яка була б придатною для всіх білків.

2.4.2. Хроматографічне розділення мембранних білків

Білки, вивільнені з мембран шляхом солюбілізації, поведуться, як звичайні водорозчинні білки, і їх можна фракціонувати за допомогою стандартних хроматографічних методів, які базуються на відмінності білків за розміром, зарядом і специфічністю взаємодії з лігандами.

Розділення за розміром. Якщо досліджуваний мембранний білок є стабільним, при його подальшому очищенні проводять фракціонування мембранної фракції за допомогою гель-фільтрації у водному буфері з детергентом. Важливо, щоб концентрація детергента дорівнювала або перевищувала критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ). Інтегральні білки, оточені мономолекулярною "шубою" детергента, можуть мати уявну молекулярну масу, яка вдвічі перевищує ту, що відповідає їхній амінокислотній послідовності. Крім цього, багато білкових комплексів не підлягає дисоціації в неденатуруючих детергентах. Тому для колонкової хроматографії мембранних білків застосовують сорбенти з великим розміром пор, наприклад, сефарозу, агарозу та поліакриламід. У деяких випадках при очищенні білків можуть виникнути ускладнення у зв'язку з агрегацією білків або їх незворотною адсорбцією на хроматографічних носіях. Узагалі ефективність початкових етапів фракціонування залежить насамперед від правильного вибору детергента. Якщо існує ймовірність того, що під час хроматографії може мати місце незворотна адсорбція білка, можна спробувати замінити носій. Наприклад, носії, пригото-

вані на базі поліакриламід, є більш інертними, і їх можна використовувати як з м'якими, так і з жорсткими (тобто денатуруючими) детергентами, проте слід бути обережними при роботі з органічними розчинниками.

Для фракціонування інтегральних мембранних білків ефективно застосовуються високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) і високошвидкісна рідинна хроматографія білків (ВРХБ), особливо в тоді, коли процес очищення лімітується кількістю білка та часом його фракціонування. Сьогодні існує багатий вибір носіїв для ВЕРХ і ВРХБ, переважно на базі силікагелю та синтетичних полімерних матеріалів (наприклад, гідроксильованих поліетерів), і їх асортимент постійно розширюється. Розмір пор носія визначається діапазоном молекулярних мас (від 500 до $2 \cdot 10^7$ Да) білків, що розділяють (від 500 до $2 \cdot 10^7$ Да). У присутності неденатуруючих детергентів ефективність розділення, як правило, знижується. Більшість таких носіїв можна використовувати в нейтральних органічних розчинниках, детергентах й у присутності денатуруючих агентів, таких як гуанідинхлорид і SDS.

Особливо обережним при проведенні хроматографії мембранних білків слід бути, коли таке розділення здійснюється за екстремальних значень рН. При такому розділенні дуже кислі умови в поєднанні з органічними розчинниками сприяють прискоренню руйнування носіїв, приготованих на базі силікагелю. Ще деструктивнішими є лужні умови за $\text{pH} > 8$. У результаті видалення з носія захисних груп посилюється незворотна адсорбція на ньому поліпептидів. Тому за екстремальних умов застосовуються носії типу сефадексу та поліакриламід для фракціонування компонентів суміші за розміром. Оскільки подібні умови руйнівним чином діють як на носій, так і на пептид, хроматографію слід проводити за низьких температур і високих швидкостей елюювання.

Розділення за зарядом. Іонообмінна хроматографія. Для виділення мембранних білків можна використовувати класичні іонообмінні системи, які застосовуються при очищенні білків, за умови, що вихідний заряд поліпептиду не нейтралізується при додаванні заряджених детергентів або при його розчиненні в сильних кислотах і лугах. Найчастіше застосовуються слабкозаряджені ДЕАЕ- та КМ-іоніти (на базі, наприклад, целюлози та декстрану), проте, якщо їх використовувати у присутності детергента, слід упевнитись, що останній не перешкоджає взаємодії білка з адсорбентом [7]. Ефективність очищення на цих носіях достатньо залежить від природи білка, який виділяють. Якщо білок є гідрофільним, можна підібрати умови, за яких він міцно зв'язуватиметься з іонітом. Навпаки, білки, які значною мірою занурені в бішар і тому є міцно обкутаними детергентною оболонкою, мають набагато менші можливості для взаємодії із зарядженим сорбентом.

З урахуванням цього ДЕАЕ-колонки врівноважують буфером з низькою іоною силою (наприклад, $<0,1$ моль/л трис-НСІ або фосфатним буфером), що містить детергент (порядку 0,1 %) і, можливо, фосфоліпід (0,1 %), за рН 6,5–8,0. Елюювання проводять сольовими розчинами зро-

стаючої концентрації (наприклад, 0–1 моль/л NaCl або KCl), які також містять детергент та/або фосфоліпід.

КМ-сорбенти врівноважують за слабкокислих рН 5,5–7,0, а для елюювання найчастіше використовують розчини з градієнтом рН, а не солі. Розділення мембранних білків на ДЕАЕ- та КМ-целюлозі виконують за допомогою сумішей органічних розчинників (наприклад, хлороформ/метанол) з різним вмістом води.

Для ВЕРХ і ВРХБ отримано іонообмінні силікагелі та синтетичні смоли з різними розмірами пор. За своєю ємністю в перерахунку на загальний білок вони є у 20–30 разів ефективнішими, ніж звичайні носії для гель-фільтрації. Ще одним носієм, застосування якого виявилось успішним для дослідження мембранних систем, є гідроксилапатит.

Ізоелектричне фокусування. Для мембранних білків у нативному стані характерною є така сама різниця за ізоелектричними точками, як і для водорозчинних білків [7]. Ці відмінності можна використовувати для ефективного очищення білків методом ізоелектричного фокусування. Білки мігрують під дією електричного поля у градієнті рН, і, коли даний білок досягає ділянки, яка відповідає його ізоелектричній точці, подальша міграція припиняється – він ніби "фокусується". Цим методом можна досягти дуже тонкого розділення компонентів, навіть до відокремлення фосфорильованого білка від його нефосфорильованої форми. Існують кілька способів формування градієнта рН за допомогою амфолітів при використанні деяких стабілізаторів – поліакриламідних та агарозних гелів або градієнта густини гліцеролу, сахарози та сорбітолу. Для розчинення мембранних білків необхідні детергенти, і їх слід підбирати таким чином, щоб вони не змінювали заряду білка, не спотворювали градієнт рН і самі не підлягали фокусуванню. Зазвичай використовуються неіонні детергенти, хоч у принципі можна також застосовувати й цвітер-іонні сполуки. Як правило, корисно починати фракціонування з досить широкого діапазону рН 3–10, постійно звужуючи його до 2 так, щоб приблизно всередині цього інтервалу фокусувався досліджуваний білок. При вивченні основних мембранних білків (рІ ~7) часто доцільно додатково проводити електрофорез у градієнті рН, що формується, коли зразок наносять у кислій зоні гелю. У цій системі градієнт рН не досягає повністю рівноважного стану, і тому положення білка не відповідає точному значенню його рІ. Розділення проводять за температури 0–4 °С і продовжують його щонайменше протягом чверті терміну (1–2 год), необхідного для досягнення постійної напруги. Цей метод можна використовувати як для аналітичного, так і для препаративного розділення. Його ефективність значною мірою залежить від наявності чутливого методу кількісного визначення досліджуваного білка, від сольобілізуючої здатності детергента по відношенню до цього білка і, що є особливо важливим, від можливості запобігти його агрегації та/або осадженню.

Хроматофокусування. Одним з найперспективніших методів очищення інтегральних мембранних білків є хроматофокусування, яке біль-

ше відповідає препаративній, ніж аналітичній меті [7]. Цей метод є подібним до ізоелектричного фокусування і відрізняється тим, що градієнт рН формується не в буфері, а на нерухомому наповнювачі колонки. Ці наповнювачі є стійкими в діапазоні рН 3–12, проте краще працюють в інтервалі рН 5–9. Їх можна використовувати в поєднанні з нейтральними органічними розчинниками, з денатуруючими агентами (8 моль/л сечовина, 6 моль/л гуанідинхлорид), а також з детергентами – як незарядженими (наприклад, дигітонін, тритон X-100), так і цвітер-іонними (CHAPS). Метод є швидким, ефективним і недорогим.

Гідрофобна хроматографія. Сьогодні все більш широкого застосування набуває також гідрофобна хроматографія, при якій білки й пептиди зв'язуються з гідрофобними групами, що є ковалентно приєднані до носія [7]. Адсорбція білків на носії, наприклад, на октил- абор фенолсефарозі, або на суперозі, відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій і посилюється за високих концентрацій солей (наприклад, у 50–80 % сульфаті амонію), за низьких рН і за високих температур. Білок потім елюють сольовими розчинами з концентрацією, що зменшується. Щоб полегшити розділення й підвищити вихід білка з колонки, до елюючого буфера можна включити етиленгліколь, метанол або етанол. Такий самий результат дає підвищення рН і пониження температури. Проте застосування даного методу є обмеженим для більшої частини інтегральних мембранних білків. По-перше, ефективність модифікованого носія різко знижується у присутності детергента (і ще сильніше – у присутності органічних розчинників). По-друге, розділення інтегральних мембранних білків швидше за все буде незадовільним. У деяких випадках цей метод може бути корисним для відокремлення інтегральних білків від периферичних.

Хроматографія з оберненою фазою. Це особливий вид хроматографії, яка є найбільш близькою до ВЕРХ та ВРХБ. До макропористого носія (з діаметром пор 250 Å і більше) хімічно пришивають ціанпропільні або (ди)фенільні залишки або найчастіше – *n*-алкільні ланцюги, що містять від 2 до 12 CH_2 -груп. Як правило, чим більшим і гідрофобнішим є білок або пептид, тим коротшим має бути вуглеводневий ланцюг на носії (ланцюг C_4 є особливо ефективним для великих пептидів, а ланцюг C_{18} – для малих).

Для того щоб продовжити термін використання носія та зменшити ймовірність виникнення артефактів, слід вибирати такі носії, які підлягали захисній модифікації, тобто блокуванню силанольних залишків, що не містять ланцюгів C_4 – C_{18} , за допомогою низькомолекулярних розгалужених силанів [7].

Велике значення має вибір розчинника (рухомої фази), хоч слід зазначити, що на сьогодні запропонована лише обмежена кількість систем. Унаслідок нестабільності силікагелевих носіїв розчинники з лужними рН не використовуються, водночас за нейтральних рН часто відбувається розширення піків і погіршується розділення. Це пояснюється взаємодією аміногруп пептиду із силанольними залишками носія. У кислих умовах силанольні групи є протонованими, й тому переважають гідрофобні вза-

ємодії. При розділенні звичайної суміші пептидів елюювання починають з 0,01–0,1 % трифтороцтової кислоти (ТФО) або пентафтормасляної кислоти. Замість них можна використовувати фосфорну або хлорну кислоти в концентрації до 0,1 %, щоб підвищити гідрофільність пептидів, але при розділенні гідрофобних пептидів ці добавки застосовують рідко. Може виявитися корисним включення до водних систем органічних амінів, наприклад, фосфату тріетиламіну (0,1 %), завдяки чому послаблюються іонні взаємодії між носієм і пептидом.

Зразки наносять на колонку в невеликому об'ємі (близько 100 мкл) водного розчинника. Для розчинення сильно гідрофобних білків і пептидів може знадобитися 90 % мурашина кислота. У міру розведення мурашиної кислоти пептиди адсорбуються на носії. Потім їх елюють системами із зростаючим градієнтом органічного розчинника, тобто системами з полярністю, що зменшується. Існує такий ряд полярності: вода > метанол > етанол > ацетонітрил > 1-пропанол > 2-пропанол > бутанол. Особливо широко використовується ацетонітрил, оскільки він має низьку в'язкість і високу розчинну здатність; крім цього, його можна придбати в очищеному вигляді (без домішок, які поглинають в УФ-ділянці). Як приклад типового градієнта можна навести перехід від 0,1 % ТФО, що містить 10 % ацетонітрилу, до 0,1 % ТФО, що містить 70 % ацетонітрилу. Для поліпшення розчинності пептидів запропоновано вводити в невеликих кількостях такі добавки, як монометоксиетиленгліколь.

Оскільки велика кількість великих гідрофобних пептидів, які утворюються при розщепленні інтегральних мембранних білків, не елюють взагалі або вимиваються з дуже низьким виходом за допомогою C_{18} -носіїв і розчинників, в окремих випадках хроматографічного очищення доводиться використовувати жорсткі умови. Наприклад, на C_{18} -сорбенті було створено градієнтний перехід від 5 % водного розчину мурашиної кислоти до 5 % розчину цієї самої кислоти в етанолі або перехід від 50 % мурашиної кислоти у воді до 50 % мурашиної кислоти в ізопропанолі або етанолі. Іншими системами розчинників, що успішно використовуються, є ацетат калію (0,24 моль/л, рН 6,5) у суміші хлороформу з метанолом з різним співвідношенням компонентів, градієнт 10–60 % HCl (12 ммоль/л), етанол і бутанол (4 : 1, о/о) в HCl (12 ммоль/л) з додаванням ДМСО до 1 % в кінці градієнта.

Виходячи із загальним емпіричних засад, можна спочатку проводити фракціонування білків і пептидів на сефадексі LH-60 і LH-20, а потім об'єднані фракції, що містять пептиди з близькою молекулярною масою, піддавати хроматографії з оберненою фазою. Висушування пептидів і білків слід проводити обережно на роторному випаровувачі до вологого стану зразка з подальшим видаленням залишків розчинника ліофілізацією.

Афінна хроматографія. Цей метод дозволяє проводити очищення, базуючись на біологічній спорідненості або активності, які мають лише певні компоненти в суміші білків і пептидів, що підлягає розділенню [7]. Мембранозв'язані ферменти, наприклад, можуть адсорбуватися на нерозчинних носіях, з якими ковалентно сполучені аналоги субстратів, про-

стетичні групи або специфічні ефектори. Рецептори зв'язуються з іммобілізованими фармакологічними препаратами або гормонами. Отже, для успішної реалізації цього підходу необхідно солюбілізувати мембрани в таких умовах, щоб досліджуваний білок зберіг свою біологічну активність. Адсорбований білок звичайно знімають з носія за допомогою агента, який ефективно конкурує з іммобілізованим лігандом за центр зв'язування. Цим методом можна як концентрувати, так й очищувати білок.

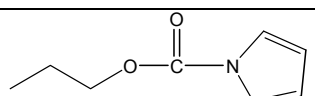
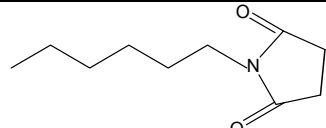
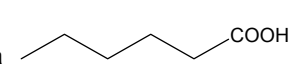
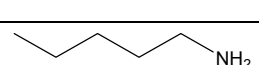
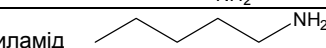
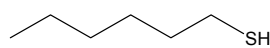
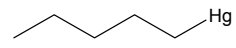
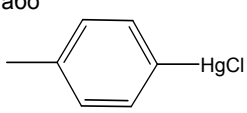
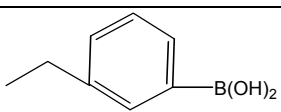
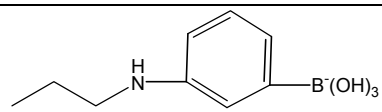
Носії. Як нерухомий носій можна використовувати цілу низку матеріалів – декстрану, целюлозу, силікагелі, скло й синтетичні смоли, проте найбільш ефективними виявились сефароза, агароза, поліакриламід і полістирол. При виборі гелю з необхідним розміром пор слід брати до уваги передусім розмір утвореного комплексу білок – ліганд. При цьому потрібно мати на увазі, що рецепторний білок може складатися з кількох субодиниць і що зв'язування детергента приводить до значного збільшення розмірів солюбілізованого білка. Носії активують таким чином, щоб вони набували здатності ковалентно зв'язувати специфічний ліганд. Численні активовані сорбенти виробництва фірм "Beckman", "Pharmacia", "BioRad" мають різні реакційно-здатні групи, зв'язані з гелем або безпосередньо, або через подовжений місток (спейсер) (табл. 6). Ці містки підвищують доступність іммобілізованого ліганду для білка та зменшують стеричні обмеження, що є особливо важливим для розчинів, що містять детергенти.

Ліганди. Майже в усіх випадках ліганд зв'язують з носієм через первинні аміно-, карбокси- та сульфгідрильні групи. З табл. 6 видно, що придатні функціональні групи можна ковалентно пришити до носія. У деяких випадках необхідну активну групу можна спеціально ввести в ліганд або білок. Вибір носія визначається структурою та властивостями ліганду.

Існує ще ціла низка аргументів, які слід мати на увазі, коли як ліганди використовують білки. По-перше, при ковалентному зв'язуванні білка з носієм необхідно подбати про збереження активності білка. Для цього на стадії зв'язування часто потрібна присутність субстрату, аналога, протестичної групи або яких-небудь іонів, необхідних для вияву функціональної активності. Можливо, ці компоненти доведеться додавати й при підготовці афінного сорбенту для хроматографії.

По-друге, активні групи, що не прореагували, слід блокувати яким-небудь інертним модифікатором (наприклад, етаноламіном) до використання афінного сорбенту. Амінокислоти як блокуючі агенти є менш придатними, оскільки вони надають носію іонообмінні властивості. По-третє, крім центрів специфічного зв'язування білки мають також більш великі ділянки, які можуть діяти як центри гідрофобної взаємодії або – що є більш звичним – як іонообмінники. Присутність детергента часто приводить до маскування або заповнення гідрофобних порожнин у білковій молекулі, завдяки чому неспецифічні гідрофобні взаємодії послаблюються.

Таблиця 6. Афинні носії та їхня специфічність [7]

Носій/функціональна група	Специфічність ліганду	Ковалентна зшивка
Сефароза/CNBr-активована	-NH ₂	Довільна реакція
Агароза 	-NH ₂	- " -
Агароза 	-NH ₂	- " -
Агароза 	-NH ₂	Каталіз водорозчинним карбодіімідом
Агароза 	-COOH	- " -
Поліакриламід 	-COOH	- " -
Агароза  (Тіольний носій може мати захисну групу)	-SH	Може знадобитися активація сульфгідрильним реагентом
Агароза або  	-Алкілюючі агенти	Довільна реакція
Поліакриламід 	Цис-діоли, наприклад, цукри/коферменти	- " -
Полістирол 	Те саме	

Щоб послабити неспецифічні іонні взаємодії, корисно включити в буфер хлорид натрію (в концентрації, наприклад, 0,1 моль/л). Саме таким чином готують високоспецифічні афинні сорбенти, що містять пептидні гормони або антибіотики. Однак ці сорбенти мають деякі недоліки, зокрема малу

ємність, слабку афінність і жорсткі умови (наприклад, низькі рН), які часто є необхідними для елюювання зв'язаних білків. На початкових етапах фракціонування успішно застосовують хроматографію на сорбентах, що містять вуглеводзв'язуючі білки – лектини, які дуже легко пришиваються до носія й зберігають свою активність у присутності м'яких детергентів.

Завдяки специфічності до різних цукрів лектини можна використовувати для фракціонування глікопротеїнів, але найчастіше вони зв'язують одночасно кілька вуглеводвмісних мембранних компонентів. Хоч зв'язані глікопротеїни легко елюються за допомогою різних цукрів, здатність одного й того самого вуглеводу взаємодіяти з кількома лектинами припускає, що їхня специфічність є не дуже суворою.

Вихід білка при елюції, як правило, дуже високий (>90 %), особливо коли працюють з лектинами з *Lens culinaris*. Водночас конканавалін А є найменш ефективним у цьому відношенні. Унаслідок варіабельності бічних вуглеводних ланцюгів багатьох мембранних глікопротеїнів індивідуальні лектини можуть зв'язувати тільки частину з усіх різновидів даного білка.

Цей недолік можна подолати, використовуючи лектини із схожою, але достатньо широкою специфічністю.

Практичні рекомендації. Зразки слід наносити на колонку, що містить афінний сорбент (наприклад, 10–20 мл упакованого сорбенту), за низької швидкості потоку (2–3 мл/год), щоб умови взаємодії були максимально близькими до рівноважних [7]. За підвищених температур (20–35 °С) зв'язування може посилюватися. У деяких випадках буває корисним відразу після нанесення зразка на якийсь час зовсім зупинити потік буфера крізь колонку. Після цього носій слід промити 5–10 об'ємами буфера, рівними об'єму колонки, щоб видалити незв'язані або слабко зв'язані компоненти. На цьому етапі можна підвищити іонну силу буфера для послаблення неспецифічного зв'язування. Елюючий буфер пропускають крізь колонку доти, поки який-небудь параметр (наприклад, оптична густина за 280 нм) не досягне фонового рівня. Це показує, що носій вже достатньо промитий. Елюювання специфічно зв'язаних компонентів зазвичай відбувається швидко; вони виходять з колонки у вигляді асиметричного піка з крутим переднім фронтом і розтягнутою хвостовою ділянкою.

Після промивання концентрованими сольовими розчинами сорбент можна зберігати впродовж 1-2 років у розчині, що містить інгібітори протеаз, антибактеріальні агенти, а також субстрати або його аналоги. Перед використанням сорбенти ретельно промивають буфером (до 100 власних об'ємів), в якому передбачається наносити білок. Іноді для врівноваження сорбенту з буфером його промивають 0,01 % SDS.

Отже, на сьогодні існує велика кількість різноманітних хроматографічних методів, застосування яких дозволяє провести ефективне очищення та розділення інтегральних і периферичних мембранних білків.

2.4.3. Очищення мембранних білків на імуносорбентах

Перспективним підходом для очищення мембранних білків є імуноафінний метод із застосуванням моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла зв'язуються з носієм, як сорбент використовується активована CNBr сефароза 4В ("Pharmacia" або "BioRad") [7]. На колонку, заповнену сорбентом, наносять мембранну фракцію, з якої необхідно отримати білок. З такими носіями вдається зв'язати 1–10 мг білка на 1 мг геля. Антитіла також можна зв'язати з модифікованою целюлозою, хоч даний сорбент має високу ємність, проте погано пропускає елюючий розчин. Тому сорбенти на базі целюлози використовують для очищення в об'ємі, а не на колонках.

Нанесення антигену на імуносорбент можна проводити за 4 °С або за кімнатної температури. За останньої зв'язування йде швидше, проте ці умови не є придатними, якщо антиген є нестабільним або легко піддається протеолізу. Інкубацію антигену із целюлозним імуносорбентом слід проводити при постійному перемішуванні впродовж 30–60 хв за 20 °С або впродовж 4 год за 4 °С. Аліквоту суміші центрифугують (2 хв за 9000 g), відбирають супернатант і вимірюють ступінь зв'язування антигену імуносорбентом.

Для руйнування зв'язку антиген – антитіло використовують буферні розчини з високим або низьким значенням рН, хаотропні іони або концентровані сольові розчини та конкуруючі ліганди (табл. 7). Переважно мембранні білки елюють за лужних рН. Для цього широко використовують діетиламін (50 ммоль/л, рН 11,2–11,5).

При цьому важливо швидко нейтралізувати елююваний фермент. Для цього, наприклад, фракції об'ємом 1 мл з колонки можна зібрати у пробірки, що містять по 0,1 мл трис-НСІ (2 моль/л, рН 6,8). Буфери з кислим рН використовують рідше, і в цьому разі альтернативою розчинам з лужним рН виступають буфери з високою іонною силою й хаотропні іони. В окремих випадках вдається підібрати умови елюції спеціально для даних антитіл. Наприклад, при виділенні рецепторів для елюювання можна використовувати ліганд, з яким конкурують моноклональні антитіла.

2.4.4. Розділення мембранних білків методом електрофорезу

Для розділення й аналізу мембранних білків ефективно використовують методи електрофорезу. Якщо досліджуваний білок вдається ідентифікувати в умовах одновимірного та двовимірного електрофорезу, його можна елювати з гелю в умовах, за яких можна провести подальше визначення амінокислотного складу й часткової амінокислотної послідовності.

Детергенти. Для мембранних білків запропоновано електрофоретичні системи, які містять неденатуруючі детергенти, наприклад, тритон X-100 і дезоксихолат, проте при цьому не вдається досягти високоефективного розділення [7]. Тому для отримання гомогенних білків застосову-

ють метод електрофорезу із зсувом заряду. Значного поширення набули електрофоретичні методи, наприклад, електрофорез у поліакриламідному гелі, з використанням денатуруючих агентів. До таких агентів належать додецилсульфати натрію та літію, які мають високу солюбілізуючу здатність. Хлоральгидрат є також корисним агентом, проте мало використовується через свою токсичність, особливо в тих високих концентраціях, які необхідні при проведенні електрофорезу.

Як правило, кількість SDS, доданого до мембранного препарату, має щонайменше у два рази перевищувати загальну суху вагу препарату, щоб концентрація SDS зберігалася на рівні 1 % і вище. рН буфера можна змінювати в широких межах (від 5 до 9) [95]. Часто до суміші додають відновлюючі агенти. Оскільки β-меркаптоетанол за високих концентрацій (1–5 %) може викликати протеоліз, застосовують переважно дитіотреїтол, який можна додавати до буферних систем у низьких концентраціях (2 ммоль/л). Присутність сахарози та гліцеролу на стадії солюбілізації мембран також не є обов'язковою, але їх можна вводити до буфера, який застосовується для нанесення зразка на гель.

Після солюбілізації зразок можна відразу піддавати електрофоретичному розділенню або спочатку проінкубувати за різних температур (наприклад, упродовж 60–90 хв за 20–30 °С), щоб дезагрегувати білок до мономерного стану. Зразок можна також прокип'ятити протягом 3 хв для руйнування протеаз.

Протеоліз при солюбілізації може становити серйозну проблему, оскільки денатуровані мембранні білки є зручними субстратами для протеаз, які зазвичай є стійкими до дії SDS і можуть навіть активуватися у процесі розчинення мембран.

Ураховуючи це, краще відразу готувати мембрани в буфері, що містить один або кілька протеазних інгібіторів. Якщо необхідні додаткові заходи, то корисно разом із SDS додавати ще ФМСФ (фенілметилсульфонілфторид) (1 ммоль/л) та ЕДТА (10 ммоль/л). Перед електрофорезом зразок можна сконцентрувати ліофілізацією, ультрафільтрацією або осадженням 50–90 % ацетоном.

Метод електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) з використанням додецилсульфату натрію (SDS) як дисоціюючого агента є перспективним методом виділення мембранних білків [33]. Цей детергент у високих концентраціях (> 0,1 %) з'єднується з поліпептидами й перешкоджає їх агрегації.

Метод електрофорезу в ПААГ характеризується високою роздільною здатністю й високою чутливістю, хоч використовуються також й інші гелі. ПААГ є прозорим, має велику механічну міцність, є однорідним за складом і хімічно інертним. Він дозволяє досліджувати розчини різної концентрації й у невеликих об'ємах (до 0,001 мл), використовувати охолодження й швидко проводити розділення (протягом 60–70 хв).

Таблиця 7. Умови елюції білків з імуносорбенту на базі моноклональних антитіл [7]

	Умови елюції	Білки, що виділяють	
А. Високі рН	Детиламін (50 ммоль/л, рН 11,2–11,5) ± детергент, 0,1–0,5 %	Глікопротеїн Thy з мозку щура Епоксидгідролаза Рецептор Т-клітинного антигену Антигени HLA-A2, HLA-B7 Антиген W3/13 тимоцитів щура Антиген OX2 щура Загальний антиген, асоційований з гострим лімфолейкозом Рецептор трансферину Мембранний антиген вірусу Епштейна–Барр 5'-нуклеотидаза з печінки щура Лужна фосфатаза з печінки людини	
	+NaClO (14 моль/л)	С3b-інактиватор людини	
	Діетиламін (100 ммоль/л, рН 11,5) ± детергент (0,2–0,5 %)	Поверхневий глікопротеїн клітин гризунів Мембранний білок <i>Toxoplasma gondii</i>	
	2-аміно-2-метил-1-пропанол (0,6 моль/л, рН 10,2)	Лужна фосфатаза із хряща бика	
	Гліцин/ОН (0,2 моль/л, рН 10)	Ацетилхоліновий рецептор <i>Torpedo</i>	
	Лізин/ОН (20 ммоль/л, рН 11), 0,1 % три-тон X-100	Рецептор фактора росту епідермісу	
	Тріетиламін (100 ммоль/л, рН 10,0)	Кальмодулінзв'язуючий білок гризунів	
	Тріетиламін (100 ммоль/л, рН 11,5) (0,5 % дезоксихолат натрію)	F _c -рецептор гризунів	
	Б. Низькі рН	Гліцин-HCl (0,05–0,1 моль/л, рН 2,5–2,8) ± детергент, 0,1–0,2 % + NaCl (0,5 моль/л)	Ацетилхолінестерази з електричного органу Рецептор фактора росту епідермісу (денатурований)
		Оцтова кислота (0,2 моль/л, рН 2,5–3)	Ренін підщелепових залоз миші
		NaClO (5–0,3 моль/л), детергент (0,1 %)	Урокіназа Лейкоцитарний інтерферон

	Умови елюції	Білки, що виділяють
	PBS, pH 3,2; 5 % гліцерол; 0,1 % емульген 911	Цитохром P-450
	Ацетат амонію (0,2 моль/л, pH 3)	Соматомедин-С-інсуліноподіний фактор росту 1
	Етандіол (9 моль/л); NaClO (3 моль/л), лимонна кислота (0,1 моль/л, pH 2)	Лейкоцитарний інтерферон
<i>В. Хаотропні іони / висока іонна сила</i>	NaCl (1 моль/л, pH 7,4), детергент (0,1 %)	Антиген H-2K ^k
	NaCl (2 моль/л)	Нікотинові рецептори ацетилхоліну з м'язів щура
	NaCl (3 моль/л)	Лужна фосфатаза з печінки
	MgCl ₂ (2 моль/л, pH 7,4)	C9-компонент комплекта людини
	MgCl ₂ (3 моль/л, pH 6,8)	Тубулінтирозинлігаза
	Сечовина (4–8 моль/л) в PBS	Специфічний для вагітності β1-глікопротеїн
	Сечовина (6 моль/л)	Рецептор фактора росту епідермісу (денатурований)
	Гуанідинхлорид (6 моль/л), детергент (0,5 %)	Рецептор інтерлейкіну-2
	Ацетат натрію (50 ммоль/л), KCl (1 моль/л, pH 5,5)	ДНК-полімераза α

Для препаративного фракціонування в ПААГ існують два типи обладнання: колонки, заповнені гелем, і великі пластини. Препаративне розділення білків у шарах гелю з використанням великих пластин є зручнішим й ефективнішим. Воно дозволяє на одній пластині аналізувати водночас велику кількість зразків, а, крім того, пластини можна пристосувати для двовимірного розділення. Для цього пробу спочатку фракціонують у гелевому стовпчику діаметром 4 мм, а потім цей гель вдавлюють у верхню частину пластини із шаром гелю та піддають електрофорезу у вертикальному напрямку. Двовимірний електрофорез все частіше й частіше застосовується для аналізу білків мембран [84].

При використанні електрофорезу в ПААГ для визначення молекулярної маси білків дуже важливо дотримуватись правильного співвідношення між величиною пор гелю та розміром білкових частинок. Якщо діаметр частинок буде більшим за розмір пор, то молекули білка не зможуть увійти в гель. Навпаки, якщо концентрація гелю буде невеликою й розмір його пор буде значно перевищувати діаметр білкових молекул, то останні практично не затримуватимуться гранулами ПААГ.

Крім розміру, певне значення при встановленні молекулярної маси білків має форма білкових молекул. Вона повинна бути сферичною, при цьому поведінка білкових молекул під час електрофорезу буде прямо залежати від величини їх молекулярної маси. Для цього білки обробляють дисоціюючим розчином, що містить SDS або сечовину та β -меркаптоетанол. При цьому відбувається руйнування четвертинної та зміна третинної структури білка, в результаті послаблення гідрофобних взаємодій і руйнування водневих та дисульфідних зв'язків поліпептидні ланцюги набувають конформації неупорядкованої глобули. β -Меркаптоетанол при цьому застосовується для відновлення внутрішньо- та зовнішньоланцюгових дисульфідних зв'язків, сприяючи агрегації білків. Зв'язування детергента з поліпептидами надає їм більшого негативного заряду. У результаті цього білки переміщуються при електрофорезі до анода зі швидкістю, що залежить від їх молекулярної маси.

Залежність між значенням молекулярної маси та ступенем електрофоретичної рухливості білка виражають графічно. При роботі з акриламідом слід бути обережним, оскільки він є отрутою, яка не виводиться з організму.

Вивільнення білка з гелю. Після електрофорезу білки можна виявити в гелі за допомогою цілої низки методів. Оскільки передбачається подальше дослідження білків (наприклад, визначення їх амінокислотної послідовності), рекомендується використовувати кумасі синій R, ацетат натрію або KCl, а також флуоресцентні мітки, які зворотно зв'язуються. Такі реагенти, як дансилхлорид, флуорескамін, *o*-фталевий альдегід або реагенти, які застосовуються в методиці забарвлення гелю солями срібла або при виявленні глікопротеїнів, застосовувати не рекомендується – всі вони незворотно модифікують білок за аміногрупами. Найліпшими є ті процедури, при яких білок можна ідентифікувати за допомогою спеціальних лігандів (радіоактивних, флуоресцентних та ін.), які були б завчасно ковалентно

зв'язані з білком шляхом модифікації обмеженої кількості залишків (наприклад, цистеїну й тирозину), а також специфічних антитіл, мічених ¹²⁵I, або лектинів. Найефективнішою методикою вивільнення білка з гелю є електроелекція з діалізом (див. далі розділ 1, 8.4). Дуже корисним у таких випадках є звичайний діаліз. Обидва методи є придатними також у випадку висушених, а потім регідратованих гелів, проте вихід білка при цьому буде нижчим. Методи, які передбачають руйнування або розчинення гелю, дають препарати незадовільної якості або внаслідок внесення домішок, або за рахунок незворотної модифікації білка.

Після вивільнення білка може виникнути необхідність видалити SDS. Для цього використовують або спеціальні сорбенти для зв'язування детергента, або його осадження, або простий діаліз упродовж тривалого часу (5 діб) з кількома змінами буфера. У більшості випадків деяку кількість SDS залишають (хоча б для того, щоб білок продовжував перебувати в розчині). Для витіснення залишкової кількості SDS зазвичай додають у більшому надлишку інші детергенти, а в деяких випадках – і денатуруючі агенти – сечовину (2–8 моль/л) або гуанідинхлорид (2–6 моль/л). Найефективнішим підходом до видалення залишків детергента є використання органічного розчинника (наприклад, суміші FACE) з наступною гель-фільтрацією на сефадексі LH-60 або LH-20.

2.4.5. Аналіз мембранних білків

Після очищення білка можна застосовувати всі звичайні аналітичні методи вивчення його структури – відновити амінокислотний склад, визначити N- та C-кінцеві залишки, вміст вуглеводів, первинну структуру і т.д. Але перш за все слід подбати, щоб білок перебував у солюбілізованій, неагрегованій формі [7]. Це особливо важливо, коли проводиться його ферментативне розщеплення.

Розщеплення мембранних білків. Очищення пептидів, отриманих з інтегральних мембранних білків, є дуже утрудненою внаслідок їх підвищеної схильності до агрегації та поганої розчинності у більшості водних детергентів. Можливості застосування різних хроматографічних методик з використанням органічних розчинників обмежуються тим, що для розчинення пептидів часто є необхідними крайні значення рН.

З урахуванням цього пептиди розщеплюють у два прийоми. Спочатку проводять гідроліз білка в мембрані або в солюбілізованому, або в детергентному стані. При цьому розщепленню підлягає тільки дуже невелика кількість пептидних зв'язків. Найкраще, коли білок залишається в нативному стані, причому оптимальним оточенням для нього є ліпідний бішар. Вибір протеази визначається насамперед природою досліджуваного білка. Хороші результати було отримано з протеазою із *Staphylococcus aureus* V8, яка розщеплює білок за залишками глутамінової кислоти, що розміщуються на його C-кінцевій ділянці, за таких умов:

- а) фосфатний буфер (50–100 ммоль/л, рН 7,0);
- б) 1 мг/мл мембранного білка (в мембрані або в детергенті);
- в) протеаза V8 в концентрації до 2 % (в/в);
- г) 25–37 °С, час інкубації до 6 год.

Ці умови можна дещо змінити, щоб досягти ефективного розщеплення тільки за кількома точками. Фермент можна застосовувати навіть за концентрації SDS порядку 0,1–1,0 %.

Серед інших протеаз слід згадати також трипсин, хімотрипсин, термолізін та ендопротеази Ліз-С та Арг-С, інкубацію з якими можна проводити у фосфатному буфері за рН 7,0–8,0. Утворені великі фрагменти можна розділити хроматографічно в органічних розчинниках або електрофорезом у ПААГ із SDS. Якщо використовувати останній метод, корисно провести попередній електрофорез упродовж кількох годин, використовуючи агенти, які можуть блокувати N-кінець, але це може привести до розширення білкових смуг. Додавання тіоглікової кислоти (до 1 %) до робочого буфера допомагає захистити залишки метилтіоніну. Більш глибоке розщеплення здійснюють такі ферменти, як проназа, субтилізін та папаїн. Розщеплення цими ферментами разом з електрофорезом в поліакриламідному гелі можна успішно використовувати для отримання пептидних карт.

Другий етап фрагментації включає подальше розщеплення очищених великих поліпептидів з метою отримання сумішей пептидів, більш простих, ніж при розщепленні самого білка. На цій стадії протеоліз часто не доходить до кінця через погану розчинність фрагментів або їх схильність до агрегації, а також через денатуруючу дію розчинника. Ефективнішим може виявитися хімічне розщеплення особливо за залишками метіоніну за допомогою бромціану (CNBr).

Може виявитися корисним також хімічне розщеплення за залишками триптофану за допомогою *o*-йодобензойної кислоти у присутності тирозину або BNPS-скатолу, за зв'язками між аспарагіном та гліцином за допомогою гідроксиламіну та меншою мірою – за залишками цистеїну за допомогою 2-нітро-5-тіоціанобензойної кислоти. Утворені при цьому пептиди можна очистити в органічних та/або кислотних розчинників за допомогою гель-фільтрації, хроматографії з оберненою фазою, а іноді за допомогою афінних сорбентів, здатних взаємодіяти з SH-групами.

На завершення слід зазначити, що дослідження мембранних білків досі залишається складним завданням, яке потребує оригінальних підходів і нетривіальних рішень, проте методична база весь час вдосконалюється. На особливу увагу заслуговує розробка апаратури й технології приготування сорбентів для виділення гідрофобних білків і пептидів. У поєднанні із сучасними ефективними методами модифікації білків і визначення їх амінокислотної послідовності вдосконалення методів виділення створює перспективи для подальшого пізнання хімічної будови білків та їх молекулярної організації в мембранах.

2.5. РЕКОНСТРУКЦІЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

Для дослідження мембранних білків ефективно застосовуються методи їх реконструкції у везикули. Після того, як мембранний фермент очищений, для вивчення його каталітичної активності бажано, а часто й необхідно, реконструювати його із фосфоліпідами. Кінетичні характеристики багатьох ферментів *in situ* й після очищення та реконструкції є однаковими. Незважаючи на те, що властивості ферменту у штучних системах можуть змінюватися, вивчення очищених і реконструйованих ферментів надає великі переваги [18]. Зокрема, в такій системі не виникають різні конкуруючі реакції, притаманні біомембранам. Вдається усунути й інші проблеми, які ускладнюють дослідження. Тому даний розділ написано з метою висвітлити ті основні принципи й практичні підходи, які можна було б застосувати практично в будь-якій схемі солюбілізації й реконструкції. Крім того, в ньому зроблено спробу привернути увагу читача до різноманітних можливостей застосування реконструйованих систем у мембранній біології.

В ідеалі кінцевий продукт реконструкції повинен являти собою суспензію моноламельярних везикул одного розміру, що мають однакове співвідношення ліпід/білок. Везикулярний бішар повинен мати таку саму проникність, як і нативна мембрана: везикули мають зберігати захоплені непроникні іони чи молекули й мати достатній внутрішній об'єм, щоб можна було вимірити вміст захоплених ними речовин [7]. Везикули не повинні містити залишкового детергента. Мембранні білки мають бути орієнтованими й вбудованими в бішар у такий самий спосіб, як і в нативній мембрані. Бішар повинен мати певний склад, необхідний для збереження функціональної активності, притаманної нативному білку. Хоч усі ці вимоги рідко вдається виконати цілком, проте за допомогою реконструйованих систем можна одержати багато корисної інформації про структуру й функції мембран і білків. Крім того, тут завжди є необмежений простір для подальших удосконалень.

Використання реконструйованої системи дозволяє не тільки охарактеризувати ізольовану систему, а й визначити мінімальну кількість компонентів, необхідних для виявлення тих або інших біохімічних активностей. За допомогою реконструкції у фосфоліпідні везикули, наприклад, було показано, що за поглинання лактози клітинами *E. coli* відповідає тільки один білок, лактозопермеаза. Аналогічно було визначено мінімальну кількість білкових компонентів, необхідних для реконструкції дихального ланцюга *E. coli* та системи аденілатциклазної гормональної відповіді.

Для вбудовування солюбілізованих у детергенті очищених мембранних компонентів у модельні мембранні системи розроблено кілька методів. Найкраще ферменти вбудовуються в одношарові фосфоліпідні везикули. Характеристики ж білків, які активно чи пасивно збільшують іонну провідність мембрани, часто визначають після їх вбудовування у плос-

кий бішар. Плоскі мембрани зручні для електрохімічних вимірювань, які дозволяють визначити величину іонної провідності та інші характеристики, що походять від неї, наприклад, залежність частки відкритих каналів від прикладеної електричної напруги. У таких випадках, проте, важко або навіть неможливо визначити біохімічні характеристики білка, зокрема, його каталітичну активність, відмінні від іонної проникності.

Реконструкцію починають, узявши змішані міцели, що складаються з очищеного білка, детергента й ліпиду (ендогенного чи екзогенного) [7]. Іноді міцели складаються тільки з білка й детергента, а необхідність ліпиду для стабілізації досліджуваного білка можна встановити так, як описано вище. Якщо ліпід не було додано у процесі солюбілізації чи очищення білка (чи якщо потрібно додати його додатково), то це, як правило, роблять на стадії приготування міцелярного розчину, щоб одержати кінцеве мольне співвідношення ліпід/білок (позначене як ϕ), що дорівнює 2000–10000. Такий надлишок ліпиду потрібен тоді, коли реконструйовані везикули використовують для досліджень транспортних процесів, хоч у деяких випадках більш прийнятним може бути співвідношення 100–200. Ліпід можна додати у вигляді детергент-ліпідних міцел чи нашарувати його на дні колби у вигляді тонкої плівки, над якою потім перемішують детергент-білковий розчин, доки в нього не перейде весь ліпід. Бажано всі ліпідні суспензії зберігати в атмосфері інертного газу.

Для вбудовування мембранного білка в ліпідну везикулу перш за все необхідно позбавитися детергента, який міститься у препараті білка, який, якщо він присутній у значній кількості, дестабілізує фосфоліпідний бішар. Зазвичай, детергент видаляють уже із суміші білка із фосфоліпідом, але в деяких випадках білок очищують від детергента до початку реконструкції. Для видалення детергента використовують гель-фільтрацію, діаліз або адсорбцію на поверхні кульок з полістиролу (Bio Beads SM-2).

Останній метод використовують, у першу чергу, для видалення тритону X-100. Усі наведені методи досить ефективні, але слід мати на увазі, що навіть після дуже інтенсивних обробок у системі завжди залишається та чи інша кількість зв'язаного детергента.

Методи реконструкції можна поділити на дві групи [18]:

1. Процедури (умови), за яких білок спочатку очищають від детергента, а потім проводять реконструкцію.

2. Процедури, за допомогою яких білки й фосфоліпіди змішують у присутності детергента, а потім видаляють детергент до створення протеоліпосом. Єдине обмеження полягає в такому: обраний фосфоліпід повинен мати здатність до формування стабільних бішарів. Не можна, наприклад, використовувати ненасичені фосфатидилетаноламіни. Дуже зручним є сумарний фосфоліпід із соєвих бобів, оскільки він відносно недорогий, легко доступний та його можна використовувати в багатьох випадках.

Реконструкція без надлишку детергента. Умови включення мембранних білків у попередньо сформовані везикули часто збігаються з умовами, які сприяють злиттю фосфоліпідних везикул. В основі обох процесів лежать певні порушення бішарової структури, або утворення "дефектів", які могли б полегшити як вбудовування білка, так і злиття везикул. Механізми цих процесів вивчені недостатньо. Можливим ускладненням у використанні цих методів є агрегація білка.

Реконструкція шляхом включення білка в заздалегідь сформовані везикули. Цей метод можна використовувати далеко не завжди й переважно для реконструкції не пронизуючих бішар білків з обмеженою гідрофобною поверхнею, наприклад, цитохрому b_5 і β -гідроксибутиратдегідрогенази. Конформація вбудованого таким чином білка, проте, відрізняється від нативної.

Реконструкцію шляхом включення мембранних білків у заздалегідь сформовані везикули було успішно здійснено в кількох випадках. Цей спосіб (рис. 15, Б) забезпечує більш однорідну орієнтацію білка у везикулах. Білки з невеликими гідрофобними "хвостами" (коліцин Ia або цитохром b_5) включаються в ліпосоми спонтанно, при цьому часто необхідні ліпіди цілком певного типу. Таким методом було проведено, наприклад, реконструкцію асіалоглікопротеїнового рецептора печінки.

Мембранозв'язану форму гуанілатциклази, очищену й солюбілізовану в 0,1% лубролі РХ, інкубують з ліпосомами впродовж 1–5 год і потім виділяють реконструйовані везикули центрифугуванням за прискорення 300 000 g упродовж 30 хв (інший варіант цього методу наведено нижче при описі методики заморожування – відтаювання). Виміри ферментативної активності у фракції везикул показали, що на відміну від деяких інших мембранних білків гуанілатциклаза в ліпосомах має V_{\max} у 10 разів нижчу, ніж у розчинній формі. При цьому ферментативна активність значною мірою залежить як від складу фосфоліпідів, так і від природи їх жирних кислот, хоч прямої залежності цих ефектів від довжини й ступеня ненасиченості жирнокислотних ланцюгів не виявлено.

Реконструкція за участю амфіфільних каталізаторів. У деяких роботах показано, що додавання до білково-фосфоліпідної суміші амфіфільних речовин у низьких концентраціях полегшує вбудовування у везикули таких мембранних ферментів, як бактеріородопсин або цитохром s -оксидаза. Як амфіфільні речовини використовували холестерол, коротколанцюгові фосфатидилхоліни та жирні кислоти. Перевагою даного способу є те, що в ньому відсутні жорсткі умови (процедури), в тому числі обробка надлишком детергентів, проте на даний час він є мало поширеним.

Реконструкція за допомогою заморожування–відтаювання та обробки ультразвуком. У деяких випадках для реконструкції мембранних білків з успіхом використовують метод заморожування–відтаювання з наступною обробкою ультразвуком.

Аліквоту білка, що не містить ліпідів і детергента, змішують з водяною дисперсією ліпідів. Суміш обробляють ультразвуком або швидко замо-

рожують у рідкому азоті, потім відтаюють і знову використовують ультразвук [7]. Перевага цього методу полягає в тому, що він є швидким і не потребує використання детергентів. Однак його застосування є обмеженим, оскільки більшість мембранних білків при видаленні ліпідів і детергентів зазнають незворотної денатурації. Денатурація може також відбуватися під впливом ультразвуку протягом кількох секунд. Крім того, різниця в потужності й конструкції ультразвукових установок дуже ускладнює стандартизацію умов озвучування.

За допомогою такого комбінованого підходу було реконструйовано комплекс, що містить хлорофіл a/b.

Мембрани хлоропластів солюбілізували в 1,5 % тритоні X-100 за кінцевої концентрації хлорофілу 3 ммоль/л. Отриману суспензію додавали до рівного об'єму ліпідів (10 мг/мл), оброблених ультразвуком, перемішували й потім три рази проводили операцію заморожування–відтаювання. Залишки тритону X-100 видаляли смолою біобілдс SM-2, зразок центрифугували для відділення смоли й потім тричі піддавали заморожуванню–відтаюванню. У результаті були отримано переважно моноламелярні везикули з невеликими домішками більш великих мультіламелярних фрагментів.

Іноді для полегшення реконструкції використовують просту обробку ультразвуком [18]. Білок спочатку вбудовується в маленькі везикули з високою кривизною. Вважається, що заморожування–відтаювання потрібно для злиття дрібних протеоліпосом у більш великі та однорідні за розмірами.

Реконструкція з використанням детергентів. На даний час для реконструкції мембранних білків найчастіше застосовують методики, які складаються із солюбілізації суміші білка й фосфоліпиду з детергентом і наступним видаленням детергента. Після його видалення білок і фосфоліпід спонтанно формують одношарові везикули, які цілком придатні для ензимологічних досліджень [78]. Вибирають детергенти з високою критичною концентрацією міцелування й малими розмірами міцел для того, щоб їх можна було легко видалити діалізом чи гель-фільтрацією. Найчастіше використовують холат натрію й октилглюкозид. Розподіл отриманих везикул за розмірами визначається співвідношенням детергент : фосфоліпід, а також здатністю й швидкістю видалення детергента. Діаліз використовують як більш повільний метод. Як приклад можна навести вбудовування цитохром с-оксидази та Na^+ , K^+ -АТФази [52].

За допомогою цієї методики можна ввести у везикули відмінні від фосфоліпідів речовини, наприклад, холестерол або убіхінон. У ряді випадків виникає необхідність у достатньо швидкому видаленні детергента, особливо, якщо білок нестабільний при його надлишку. Тоді застосовують гель-фільтраційну хроматографію, яка також дозволяє ефективно відокремити білково-ліпідні везикули від детергента (наприклад, під час реконструкції гліцери-3-фосфатидилінозитолтрансферази й фосфатидилінозитолсинтази).

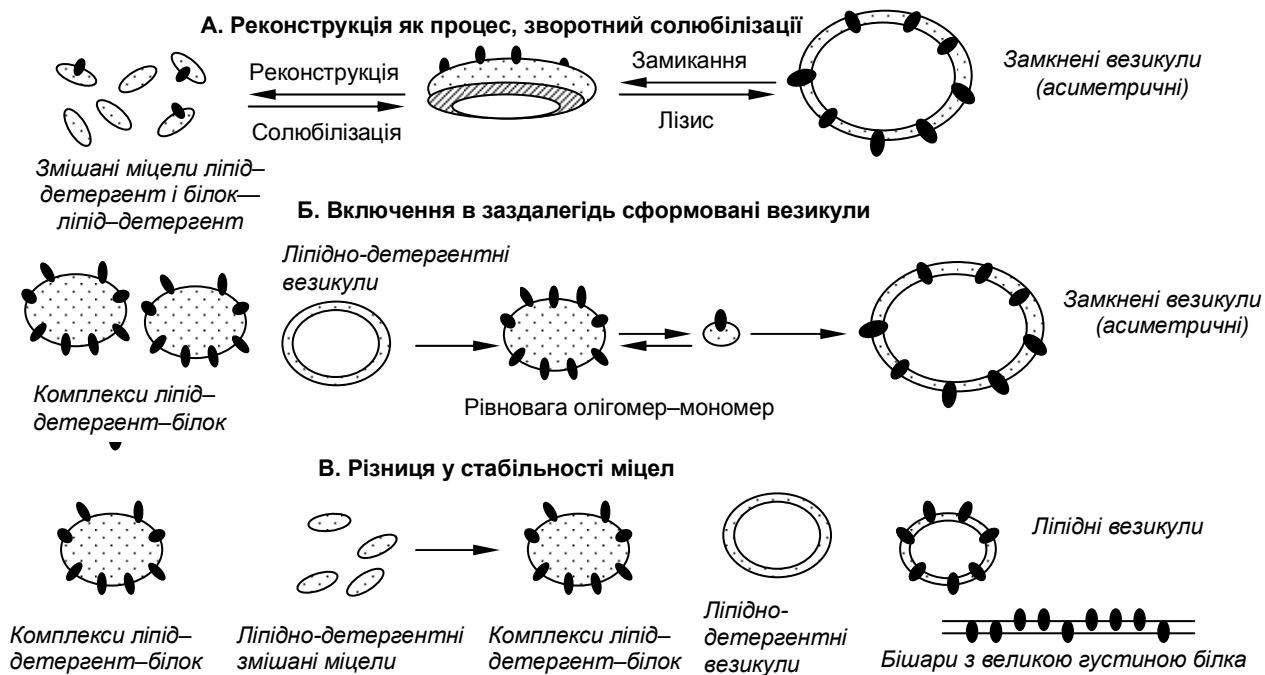


Рис. 15. Різні способи реконструкції мембран із солюбілізованих компонентів при видаленні детергента [7]

Ще більш швидким є метод розведення, коли білково–ліпідно–детергентну суміш розводять до концентрації детергента набагато меншої, ніж критична концентрація міцелоутворення. При цьому спонтанно утворюються білково-фосфоліпідні везикули, які можна відокремити від детергента центрифугуванням.

Видалення детергента під час реконструкції. Для формування везикул слід видалити детергент зі змішаних міцел, так щоб довільно міг утворитися фосфоліпідний бішар. Методи видалення детергента було описано в 2.4.1.

Найчастіше при реконструкції мембранних білків використовують метод діалізу, а детергентом є холат. Тритон X-100 важко видалити діалізом, оскільки цей детергент має низьку ККМ. Тому його рідко застосовували для реконструкції, поки не з'ясувалося, що гідрофобні смоли біобілдс SM-2 й амберліт XAD-2, які адсорбують детергенти, можуть прискорити видалення тритону X-100. Із цією метою попередньо промиті смоли просто додають до діалізуючого буфера. Такий спосіб видалення детергента було використано для реконструкції натрієвого каналу.

При іншому методі реконструкції змішаний міцелярний розчин розводять до концентрації нижче ККМ солюбілізуючого детергента, в результаті чого ліпіди й білки асоціюють з утворенням везикул. Детергент, що залишився у везикулах, можна потім видалити фільтрацією чи короткочасним діалізом. Цей підхід уперше застосували для реконструкції цитохромоксидази, солюбілізованої холатом, а недавно його було використано для реконструкції родопсину.

Детергент можна також видалити за допомогою гель-фільтрації ліпідно-білково-детергентного розчину. Гель-фільтрація виявилася дуже ефективною при реконструкції таких мембранних білків, як АцХР, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза й білок, що бере участь у транспорті лактози.

Переважно для очищення мембранних ферментів використовують тритон X-100, але він не зовсім зручний для реконструкції, оскільки його важко вилучити із системи. Для видалення тритону використовують кульки з полістиролу, й однією з проблем є втрата білка через його сорбцію на поверхні кульок. Як приклад білка, що реконструювали цим методом, можна навести натрієвий канал.

І, нарешті, для реконструкції застосовується метод, який базується на диспергуванні суміші холестерол–фосфоліпід–білок у діетиловому етері з наступним випарюванням оберненої фази. Проте малоімовірно, що багато білків витримують таку процедуру.

Морфологічна характеристика реконструйованих білково-фосфоліпідних везикул (протеоліпосом). Для повної характеристики реконструйованої системи необхідно знати морфологію отриманих частинок. В ідеалі реконструйовані везикули мають бути гомогенними за формою, розміром і характером розподілу в них білка. Проте насправді при реконструкції нерідко утворюється гетерогенна суміш як ліпідних,

так і ліпідно-білкових везикул, що може серйозно ускладнити вивчення білків, що виконують транспортні функції [7]. Для морфологічної характеристики везикул використовується ціла низка методів.

Електронна мікроскопія. Візуальний аналіз реконструйованих мембран за допомогою електронної мікроскопії – це найкращий спосіб характеристики частинок, присутніх у зразку, за розміром і формою. Найчастіше використовують два методи – негативне контрастування й заморожування–сколювання. Прийоми, що використовуються для характеристики ліпідних везикул, як правило, придатні й для реконструйованих мембран, хоч реагенти для негативного контрастування можуть бути іншими.

При підготовці препарату для проведення електронної мікроскопії методом негативного контрастування розведену суспензію реконструйованих мембран (зазвичай у концентрації 0,1 мг ліпідів в 1 мл) наносять на мідну сіточку, вкриту полімерною плівкою типу парлодію чи формвару. На плівку як основу напилено вуглець. Зразок, що розміщений на сіточці, обробляють розчином контрастуючої солі важкого металу (уранілацетат чи фосфовольфрамат натрію) і потім надлишки розчину видаляють фільтрувальним папером. При контрастуванні реконструйованих везикул концентрацію та рН промиваючого й контрастуючого розчинів підбирають таким чином, щоб морфологія везикул за можливості не підлягала змінам. Метод негативного контрастування є дуже швидким (потрібно всього близько 30 хв на один препарат від моменту його приготування до перегляду в електронному мікроскопі). Він дозволяє проаналізувати за кілька годин велику кількість зразків. Ще однією його перевагою є те, що можна проводити аналіз зображень з досить високою роздільною здатністю за умови, що дози опромінення електронами не є настільки значними, щоб викликати радіаційне руйнування зразка. Зокрема, за електронними мікрофотографіями, одержаними за допомогою методу негативного контрастування, проводять аналіз зображень з метою реконструкції тривимірної структури мембранних білків [7].

При електронній мікроскопії методом заморожування–сколювання осаджений центрифугуванням препарат реконструйованих мембран швидко заморожують і потім сколюють, і при цьому оголюється внутрішня частина бішару. На поверхню відколу під кутом 45° напiliaють платину, а під прямим кутом – вуглець як основу. Отримана в такий спосіб платиново-вуглецева репліка відбиває рельєф мембранної поверхні, будучи її точною копією. Інтегральні мембранні білки мають вигляд опуклості або заглиблення на репліці, при цьому далеко не завжди кожна опуклість (чи внутрішньомембранна частка, ВМЧ) відповідає одному білку: нерідко кілька білків асоціюють, утворюючи ВМЧ. Переваги цього методу полягають у тому, що з його допомогою можна більш точно охарактеризувати розподіл білка в бішарі і встановити, чи є везикула моноламельярною чи багат шаровою, а також чи включені її білки всередину. Недолік же полягає в тому, що роздільна здатність методу обмежена розмірами платинових гранул, що вкривають поверхню білка, тому кіль-

кісна оцінка розміру внутрішньомембранних частинок є дуже складною, хоч і не є абсолютно неможливою.

Великих успіхів було досягнуто останнім часом у розвитку криоелектронної мікроскопії. Суть методу полягає в такому. Водяну суспензію досліджуваного препарату наносять на непокриту полімером сіточку, надлишок рідини видаляють за допомогою фільтрувального паперу, а сіточку потім занурюють у рідкий етан. При швидкому заморожуванні утворюється склоподібний лід. За допомогою спеціального охолоджувального пристосування сіточку зі зразком постійно тримають за температури рідкого азоту, завдяки чому стає можливим пряме візуальне дослідження біологічного матеріалу під електронним мікроскопом. Цей метод виключає артефакти, викликані контрастуванням і дегідратацією зразка, а сам об'єкт досліджується у придатному для нього іонному оточенні.

Гель-фільтрація та інші методи. Розміри й ступінь гомогенності реконструйованих везикул часто можна визначити за допомогою гель-хроматографії, використовуючи великопористі носії. Хроматографічні колонки можна відкалібрувати за латексними частинками стандартних розмірів. Існують дані, що розміри ліпосом, визначені за допомогою електронної мікроскопії та гель-фільтрації на каліброваних колонках, добре узгоджуються між собою [7]. Метод каліброваних колонок дозволяє дуже просто визначити розподіл білка у везикулах різних розмірів. Основний же його недолік становить тривалість елюювання (до кількох діб). Крім того, існує небезпека, що внаслідок контакту з гелем може змінитися характер розподілу везикул за розмірами, а також відбутися адсорбція аналізованих речовин на колонці.

Реконструйовані везикули можна охарактеризувати й за допомогою центрифугування. Таким способом було проведено центрифугування реконструйованого АцХР у градієнті густини сахарози, щоб установити наявність мембранних фракцій з різним вмістом білка.

Фактори, які визначають морфологію реконструйованих мембран. При вимірюванні функціональної активності інтегральних мембранних білків часто буває необхідно знати розміри й форму реконструйованих мембранних везикул. Наприклад, активність іонних каналів визначають за ефективністю захоплення радіоактивно мічених іонів замкненими реконструйованими везикулами. Везикула діаметром 25 нм (саме такі везикули зазвичай утворюються при холатному діалізі) має внутрішній об'єм $2 \cdot 10^{-18}$ мл і містить всього одну молекулу розчиненої речовини за її концентрації 1 ммоль/л. Тому навіть якщо реконструйовані мембрани мають канали, що дозволяють іонам проникати у везикули, через малий внутрішній об'єм останніх може бути утруднено вимірювання функціональної активності білка. Іншою важливою характеристикою реконструйованих мембран є орієнтація білка в бішарі. Часто буває важко кількісно оцінити активність білка в реконструйованій системі, якщо його орієнтацію в мембрані точно не встановлено і якщо не гарантовано цілісності

везикулярного бішару. Цим характеристикам реконструйованих мембран завжди потрібно приділяти серйозну увагу.

1. *Співвідношення ліпід/білок.* Як відомо, *in vivo* деякі мембрани існують у вигляді замкнених везикул навіть за низького співвідношення ліпід/білок. Водночас у випадку реконструйованих мембран це неможливо. Наприклад, АцХР-вмісні мембрани з електричних пластинок *Torpedo californica* можна виділити у вигляді великих (400 нм у діаметрі) замкнених везикул, що мають мольне співвідношення ліпід/білок (ϕ) близько 300. Проте реконструйовані АцХР-мембрани із співвідношенням $\phi = 300$ є переважно незамкненими бішаровими фрагментами, для яких не вдається виміряти внутрішній об'єм [7]. Молекулярні основи такого явища нез'ясовані; можливо, у стабілізації нативної мембрани беруть участь цитоскелетні структури, відсутні в реконструйованих системах. Більшість досліджень реконструкції мембранних білків, функціонування яких супроводжується захопленням іонів, були найбільш успішними за $\phi = 8000 - 12000$. Утім, залишається незрозумілим, для чого необхідний надлишок ліпідів – для забезпечення непроницності мембрани чи для формування везикул максимального розміру.

2. *Тип детергента.* Розмір везикул може залежати від типу детергента, який присутній у змішаних білково-ліпідно-детергентних міцелах. Наприклад, міцели, що містять холат, яєчний фосфатидилхолін і глікофорин, утворюють везикули діаметром 25 нм з внутрішнім об'ємом $2 \cdot 10^{-18}$ мл, тоді як цілком ідентичні міцели, що містять октилглюкозид замість холату, утворюють везикули діаметром 230 нм із внутрішнім об'ємом $5 \cdot 10^{-15}$ мл. Ці дослідження показали також, що морфологія везикул залежить і від вихідного співвідношення детергент/ліпід: за мольного співвідношення октилглюкозид/фосфатидилхолін 15 : 1 виходять більш великі й більш гомогенні везикули, ніж за співвідношення 5 : 1. Разом з тим, вихідне співвідношення детергент/ліпід може несприятливо позначитися на функціях реконструйованого білка. Наприклад, коли співвідношення детергент/ліпід є настільки високим, що відбувається витиснення детергентом анулярних ліпідів, багато мембранних білків незворотно інактивуються.

3. *Тип ліпиду.* Функціональна активність багатьох мембранних білків залежить від ліпідного складу їх оточення. Включення білка при реконструкції в певне ліпідне оточення дозволяє вивчити специфічний вплив ліпідів на функцію цього білка. Проте такі дослідження необхідно підкріплювати ретельною характеристикою морфології мембран, оскільки навіть незначні зміни ліпідного складу можуть сильно змінити структуру реконструйованої мембрани [56]. Ранні дослідження з реконструкції АцХР показали, наприклад, що цей білок легко включається в азолектинові везикули при холатному діалізі, але якщо як ліпід було використано фосфатидилхолін, АцХР агрегував, утворюючи ланцюги або кільця й при цьому не входячи до ліпосом. Більш того, АцХР вбудовувався у везику-

ли, отримані (також шляхом холатного діалізу) із сумарних ліпідів рецепторних мембран, але осаджувався без входження до везикули, якщо останні були приготовані з ліпідів, позбавлених холестеролу.

Процес реконструкції родопсину методом октилглюкозидного діалізу теж залежить від ліпідного складу і від співвідношення ліпід/білок. Деліпідизований родопсин (26 мкм) в октилглюкозиді (200 мм) змішували із фосфоліпідами за $\phi = 300$. Експерименти проводили з яечним ФХ, ДОФХ, ДМФХ, ПОФХ і ліпідами фоторецепторних дисків. Майже у всіх випадках кінцеве співвідношення ліпід/білок після видалення детергента становило 30–50, незважаючи на те, що спочатку воно дорівнювало 300. Виключенням були тільки випадки з ДМФ, оскільки він, на відміну від інших ліпідів, має короткі й насичені ацильні ланцюги. Змішані міцели октилглюкозиду з усіма фосфоліпідами, крім ДМФХ, є менш стабільними, ніж міцели із суміші октилглюкозид–фосфоліпід–родопсин. Тому вже на ранніх стадіях діалізу через надлишок ліпиду утворюються везикули, що не містять білка. Білоквмісні міцели, що істотно не розрізняються за співвідношенням ліпід/білок, формують везикули на пізніх стадіях діалізу (рис. 15, В).

4. Метод видалення детергента. Дуже важливою при реконструкції може виявитися швидкість, з якою видаляється детергент, оскільки функціональна активність деяких мембранних білків змінюється за тривалого впливу детергента. Швидкість його видалення може позначатися й на структурі реконструйованих мембран. Якщо при реконструкції АцХР з азолектином, ДОФХ чи ДЕФХ за $\phi = 10000$ холат видаляють діалізом упродовж 4 діб, то формуються дуже різноманітні структури. Азолектин при цьому утворює моноламельярні везикули, в які рівномірно вбудований АцХР. ДОФХ утворює везикули, в які АцХР відсутній, сам же він міститься в розчині у вигляді агрегатів; з ДЕФХ формуються великі "парасольки" з молекулами АцХР по краях. Якщо ж холат швидко видаляють методом розведення чи гель-фільтрацією, всі три ліпіди утворюють моноламельярні везикули з АцХР, вбудованим у бішар.

Дослідник, систематично вивчаючи фактори, що впливають на реконструкцію, насамперед ставить перед собою завдання успішно реконструювати функцію досліджуваного мембранного білка. Проте при цьому необхідно пам'ятати, що функціональну активність білка не вдається виявити, якщо реконструйована мембрана має невідповідну для вияву цієї функції морфологію.

5. Вплив заморожування–відтаювання. Як відомо, ліпідні везикули мимовільно зливаються за температур, нижчих температури їх фазового переходу. Здатність везикул до злиття було використано при реконструкції АцХР для одержання більш великих везикули, що мають давати сильніший функціональний відгук при вимірюванні транспортної активності, ніж вихідні везикули. Показано, що розмір везикул при заморожуванні–відтаюванні збільшується тільки тоді, коли в азолектинові везикули, що містять АцХР, включали ще й холестерол [73]. До заморо-

жування—відтаювання лише 3 % везикул мали діаметр більш 100 нм, але після цієї обробки їх частка зросла до 24 %.

Загальною проблемою, з якою стикаються при реконструкції, є гетерогенність везикул. При включенні АцХР методом холатного діалізу в ліпідні суміші різного складу було отримано дві фракції везикул, розділені у градієнті сахарози, одна з яких складалася тільки з ліпідів. Після кількох циклів заморожування—відтаювання два піки, що відповідають цим двом фракціям, злилися в один, розташований в ділянці проміжної густини розчину сахарози. Цей препарат добре захоплював радіоактивні катіони й використовувався для вимірювання іонного транспорту, проте неясно, із чим було пов'язано уявне збільшення функціональної активності — із зростанням внутрішнього об'єму везикул, з "герметизацією" мембрани чи з дією якихось інших факторів. Електронні мікрофотографії з негативним контрастуванням препаратів мембран, що містять АцХР, після процедури заморожування—відтаювання свідчать про розючу гетерогенність препаратів і помітне зростання вмісту в них багатшарових везикул. Існують також дані, засновані на результатах електронної мікроскопії заморожених відколів, щодо того, що заморожування—відтаювання мембран може привести до захоплення деяких білків везикулами, а не до включення їх у ліпідний бішар. Якщо заморожування необхідне для тривалого збереження везикул, то можна додати сахарозу, щоб запобігти утворенню багатшарових везикул при відтаюванні.

Характеристика реконструйованих везикул. У результаті застосування всіх методів, розроблених для реконструкції мембранних білків, утворюються одношарові везикули. Характеристики деяких з них детально вивчено. Це, зокрема, протеоліпосоми, які містять цитохром с-оксидазу, Na^+ , K^+ -АТФазу, цитохром b_5 і глікофорин.

Особливу увагу викликають такі характеристики везикул: 1) середній розмір везикул і розподіл їх за розмірами; 2) розподіл білка в популяції везикул; 3) орієнтація білка відносно площини бішару; 4) проникність везикул [18]. Ці характеристики є особливо важливими, якщо фермент каталізує трансмембранне перенесення речовин або іонів. Для кількісного аналізу кінетики таких ферментів необхідно знати внутрішній об'єм везикул, їхню проникність і розподіл білка. Молекули ферментів, що каталізують векторні реакції (наприклад, для цитохром с-оксидази, що переносить протони тільки в одному напрямку) мають протилежну орієнтацію й містяться в одній везикулі, працюватимуть "вхолосту", компенсуючи один одного у процесі утворення результативного іонного градієнта.

Розмір везикул і визначення внутрішнього об'єму везикул. Розмір везикул великою мірою залежить від процедури реконструкції. Для цього визначення найкраще використовувати методи електронної мікроскопії або гель-фільтрації. Після видалення детергента методом діалізу утворюються протеоліпосоми в діаметрі від 500 до 2500 Å залежно від білка та застосовуваного методу. За різних способів реконструкції розміри одержаних везикул варіюють у надто широкому діапазоні. Протеоліпо-

соми потрібного діаметра треба потім відокремити за допомогою гель-фільтраційної хроматографії.

Для визначення об'єму водної фази, включеної в реконструйовані везикули чи ліпосоми, проводять реконструкцію у присутності хромату натрію або калію (0,1 моль/л). Хромат, який не увійшов у везикули, видаляють гель-фільтрацією, а хромат, захоплений везикулами, вивільняють солюбілізацією аліквоти у тритоні X-100 (10 ммоль/л) і потім визначають його концентрацію за поглинанням світла за 380 нм. Щоб знайти питомий внутрішній об'єм, виражений у літрах на моль ліпиду, концентрацію хромату в аліквоті ділять на загальну концентрацію хромату й ліпиду у зразку.

Як інші індикатори при визначенні внутрішнього водного об'єму використовують 6-карбоксіфлуоресцеїн (0,1 ммоль/л), вміст якого визначають за його флуоресценцією, чи радіоактивні цукри, такі як [^{14}C]-лактоза або [^3H]-декстран, вміст яких вимірюють за допомогою сцинтиляційного лічильника [98].

Визначення внутрішнього об'єму полегшується, якщо мембрана містить білки, що мають властивості іонних каналів, типу АцХР і натрієвого каналу. Везикули інкубують упродовж 12 годин з радіоактивними іонами, що проникають через канал; іони, які не увійшли, видаляють за допомогою іонообмінної хроматографії й вимірюють радіоактивність іонів, захоплених везикулами.

Розподіл білка. Коли під час реконструкції застосовано діаліз для видалення детергента із суміші, яка містить надлишок ліпиду, розподіл білка між отриманими везикулами має підпорядковуватися розподілу Пуассона. Проте, водночас він може залежати й від білка, який вбудовується, та від особливостей методу. Слід зазначити, що під час спонтанне вбудовування деяких білків у задалегідь отримані ліпосоми відбувається переважно у везикули малих розмірів. Цитохром b_5 , наприклад, у 200 разів ефективніше вбудовується у везикули з діаметром 200 Å, ніж 1000 Å.

Орієнтація білка. Це питання важливе з погляду ензимології, оскільки білок, активний центр якого локалізований усередині везикули, може бути недосяжним для субстрату. Разом з тим, багато ферментів, наприклад, цитохром с-оксидаза, гліцерол-3-фосфатидилінозитолтрансфераза, бактеріородопсин, здатні вбудовуватися в мембрану таким чином, що їхній активний центр з імовірністю 75–95 % орієнтується на зовнішній поверхні везикули. Везикули, що містять цитохром с-оксидазу, за допомогою ДЕАЕ-хроматографії вдається розділити на дві популяції: з активним центром, орієнтованим усередину, і з активним центром, орієнтованим назовні. Узагалі, такий спосіб розділення є придатним і для інших білків.

Причину такої асиметрії вбудовування не встановлено. У деяких (але не в усіх) випадках орієнтована назовні частина ферменту має більший розмір, а вбудовування білка більш масивною частиною всередину везикули неефективно. Оскільки асиметрична орієнтація спостерігається й під час вбудовування білків у великі ліпосоми, асиметрія вбудовування не пов'язана з кривизною везикули, як у випадку розподілу ліпідів у везикулах малих роз-

мірів. Можливо, важливу роль відіграють якісь кінетичні фактори, проте їх важко оцінити, тому що нез'ясована природа перехідних станів.

Не можна не вказати на те, що деякі білки вбудовуються у везикули неправильним чином, тобто в конформації, відмінній від нативної. Найбільш типовим прикладом є цитохром b_5 , який залежно від методу реконструкції може перебувати в одній з двох конформацій. Така поведінка є характерною також для компонента H-2K головного комплексу гістосумісності в мишей і, можливо, для білка оболонки бактеріофага M13. Усі ці білки мають один трансмембранний гідрофобний домен, і за деяких умов він включається в бішар, перебуваючи в U-подібній конформації, коли N- та C-кінцеві аміногрупи експоновані назовні.

Найпоширеніший метод визначення орієнтації білка в мембрані полягає у вимірюванні його функціональної активності у присутності й за відсутності солюбілізуючого детергента. Деякі мембранні білки мають специфічні ділянки, розташовані на зовнішній поверхні везикул, що зв'язують з високою спорідненістю радіоактивні ліганди або токсини. Везикули, які зв'язали ліганд або токсин, можна потім відокремити від вільного токсину за допомогою хроматографії на колонці чи фільтрації через іонообмінні фільтри. Якщо зв'язування є специфічним і не залежить від присутності детергента, то, вимірюючи зв'язування до і після солюбілізації везикул, вдається визначити відсоток білків, експонованих на поверхні везикул.

Ферментативну активність можна вимірювати як у присутності детергента, так і за його відсутності, але варто ретельно поставитися до вибору детергента. Наприклад, у випадку оксидази цитохрому с тільки твін 80 (3%, о/о) не впливає на її ферментативну активність.

У багатьох мембранних білків позаклітинний домен глікозилований. У цьому разі орієнтацію білка можна визначити у присутності сіалової кислоти для нейрамінідази. Везикули, що містять білок, обробляють нейрамінідазою у присутності й за відсутності тритону X-100 і порівнюють кількість вивільненої сіалової кислоти. Недоліком цього методу є його неспецифічність: якщо реконструйований білок недостатньо добре очищений, то присутність інших глікозилуваних білків може спотворити результати.

Для з'ясування трансмембранної орієнтації білка можна використовувати моноклональні антитіла, специфічні до його зовнішнього чи внутрішнього домену. Р. Анхольт із співав. використовували моноклональні антитіла для імунопреципітації ацетилхолінових рецепторів, що були попередньо мічені радіоактивним токсином [50]. Орієнтацію визначали за ступенем зв'язування моноклональних антитіл з рецептором у присутності й за відсутності 0,3 % (v/o) сапоніну, під дією якого мембрана стає проникною.

Недолік усіх перелічених вище методів пов'язаний з тим, що вони можуть давати завищену оцінку частині молекул, які мають невпорядковану орієнтацію, якщо реконструйована мембрана є проникною для векторної мітки за відсутності детергента (чи якщо мембрана не утворює замкнених везикул). Аналогічно інтерпретація експериментів зі встановлення орієнтації білка в мембрані може виявитися помилковою, якщо

білок не включається в мембрану, а проникає всередину замкнених везикул. Ці проблеми можна розв'язати, якщо ретельно вимірювати внутрішній об'єм везикул та їхню проникність, а також проводити електронно-мікроскопічний контроль.

Існують щонайменше два методи визначення трансмембранної орієнтації білків за даними електронної мікроскопії, хоч вони, можливо, є менш надійними, ніж описані вище біохімічні підходи. Так, А. Саїто із співав. [97] запропонували фіксувати реконструйовані везикули за допомогою танінової кислоти й осмію з наступним zalиванням у смолу й одержанням тонких зрізів. У проведених ними експериментах інтенсивно профарбовувалися тільки ті білкові домени, які в нативних мембранах розміщувалися на зовнішній поверхні. Поява інтенсивно пофарбованого шару на внутрішній поверхні везикул, на думку авторів, свідчила про те, що білок не має векторної орієнтації. При використанні цього методу слід ретельно контролювати проникність мембрани в ході фарбування, щоб переконатися в асиметричному характері фарбування досліджуваного білка.

Інший метод встановлення орієнтації білка в реконструйованих мембранах за даними електронної мікроскопії базується на дослідженні препаратів, приготованих за методикою заморожування–сколювання. Показано, що в нативній мембрані родопсин завжди розміщується на поверхні відколу, що відповідає зовнішньому боку бішару, тоді як при реконструкції у фосфатидилхолінових везикулах він виявляється однаковою мірою на обох поверхнях відколу. Ці дослідники припустили, що векторна орієнтація білка, що спостерігається *in vivo*, не відтворюється при реконструкції.

Слід зазначити, що при багатьох функціональних дослідженнях мембранних білків немає необхідності в тому, щоб усі молекули досліджуваного білка були експоновані на зовнішній поверхні мембрани. Наприклад, у випадку ацетилхолінового рецептора іонний канал відкривається при зв'язуванні агоніста із зовнішнім доменом білка, тому потік іонів спостерігається тільки через ті канали, що орієнтовані відповідним чином.

Проникність. Важливість цієї характеристики для ферментів, що каталізують перенесення речовин через бішар, безперечно. Багато систем транспорту й іонні насоси вивчали після вбудовування їх у протеоліпосоми; тому протеоліпосоми, придатні для таких досліджень, повинні мати достатньо низьку проникність. Присутність білка зазвичай приводить до збільшення проникності везикул, але це збільшення значною мірою залежить від вибору ліпиду та від кількості молекул білка на везикулу.

Висловлюється припущення, що молекули деяких ліпідів завдяки своїй формі краще упаковуються навколо вбудованих у бішар білків; і саме тому згладжуються дефекти структури на межі білок–ліпід і зменшується їхня проникність для розчинних речовин. Проте прямі докази із цього приводу відсутні.

Дані щодо проникності везикул особливо важливі, коли необхідно встановити трансмембранну орієнтацію білка в бішарі чи його транспортні характеристики. А. Ван-дер-Штеен із співав. ретельно вивчили вплив

глікофору на проникність діолеїлфосфатидилхолінових везикул, одночасно вимірюючи в них вміст захопленого [^3H]-декстрану й калію [100]. Методика полягає в такому:

1. Готують везикули у присутності 0,2 % (в/о) [^3H]-декстрану.

2. Видаляють непроникний у везикули декстран хроматографією на сепарозі CL-4B.

3. Везикули, які вийшли у вільному об'єму колонки, осаджують центрифугуванням упродовж 1 год за 100 000 g, потім наносять їх на колонку із сефадексом G-50, врівноважену розчином холінхлориду, щоб видалити іони K^+ , які не увійшли у везикули.

4. Вихід іонів K^+ з везикул реєструють за допомогою калієвого електрода, а внутрішній об'єм визначають за радіоактивністю декстрану.

Припускаючи, що вихід K^+ з везикул відповідає кінетиці першого порядку, за зміною вмісту іонів K^+ у зовнішньому розчині можна визначити характерний час транспорту калію.

Визначення функціональної активності реконструйованих мембран. Основне завдання реконструкції полягає в тому, щоб створити для мембранних білків таке оточення, яке дозволило б вимірити й охарактеризувати їхню функціональну активність. Метою багатьох методів ефективною солюбілізації й реконструкції, описаних у попередніх розділах, є збереження функціональної цілісності мембранних білків і максимальне полегшення визначення їхньої активності за допомогою традиційних аналітичних методик. У цьому розділі ми розглянемо деякі загальні методи біохімічного аналізу мембранних білків як у солюбілізованому, так і в реконструйованому стані [7].

Найчастіше цей аналіз заснований на визначенні зв'язування лігандів, вимірюванні ферментативної активності й визначенні транспортних характеристик або проникності. У деяких реконструйованих системах вдається також показати встановити наявність функціонального зв'язку між різними білками.

Визначення зв'язування й ферментативної активності. Як правило, ці вимірювання можна проводити на всіх стадіях очищення, оскільки методи аналізу зазвичай застосовуються до білка в нативному оточенні, білка в солюбілізованому стані й до реконструйованого білка. Багато теоретичних і практичних питань визначення ферментативної активності та зв'язування лігандів є однаковими як для білків, які містяться в розчині, так і для білків, зв'язаних з мембранами. В обох випадках слід переконатися в тому, що зв'язування відбувається в умовах насичення, є вибірковою, стереоспецифічною, зворотною та інгібованою. Проте у випадку мембранних білків є ціла низка унікальних проблем, що заслуговують спеціального розгляду.

В умовах солюбілізації детергент може вплинути на ефективну концентрацію субстрату чи ліганду, доступного для білка. Наприклад, якщо субстрат є амфіфільною речовиною, то він може накопичуватися в міцелах детергента, що ускладнить його взаємодію з активним центром ферменту.

Під впливом детергента може змінитися конформація білкової молекули і тим самим властивості білка як ферменту. Можливо також, що детергент "оголить" активні центри ферменту чи ділянки алостеричної взаємодії, які були екрановані, коли білок перебував у мембранному оточенні.

Усе це означає, що на практиці необхідно вибирати такий метод аналізу, що гарантував би достовірні вимірювання повної активності досліджуваного білка. Для ферменту у складі мембрани та в солюбілізованому стані необхідно встановити як K_M , так і V_{max} . У випадку білків, для яких можна виміряти тільки зв'язування, варто визначити K_d і загальну кількість центрів зв'язування. Зазвичай це роблять за допомогою графіка Скетчарда. Розбіжності, що виявляються при цьому, можуть бути або артефактом, пов'язаним зі зміною присутності субстрату цього ферменту в складі мембрани чи в солюбілізованому стані, або свідченням цікавих змін властивостей самого білка.

Аналіз мембранозв'язаних білків полегшується завдяки принаймні одній обставині. При визначенні активності білка за зв'язуванням, на відміну від методів визначення ферментативної активності, в більшості випадків потрібно відокремити вільний ліганд від зв'язаного за допомогою якогось фізичного методу. У випадку мембран такий поділ вдається легко здійснити за допомогою центрифугування чи фільтрування через скловолокнисті фільтри з певним розміром пір. У деяких випадках метод фільтрування може виявитися придатним і для солюбілізованих білків. Основна проблема при аналізі зв'язування методом фільтрування полягає в тому, що промивання фільтра, необхідне для зниження фонового рівня незв'язаного ліганду, часто приводить до вимивання зв'язаного ліганду, якщо він не має високої спорідненості з білком (тобто за $K_d = 10^{-7}$ моль/л або менше).

У табл. 8 підсумовано методи відділення вільного ліганду від зв'язаного, які застосовують для мембранозв'язаних і солюбілізованих білків.

За допомогою комбінації методів аналізу зв'язування лігандів, визначення ферментативної активності й реєстрації проникності або транспорту вдається діставати корисну кількісну інформацію про структуру та функції багатьох мембранних білків як у солюбілізованому, так і в мембранозв'язаному стані.

Можливості застосування реконструйованих мембран. Методи солюбілізації й реконструкції не тільки дозволяють вивчати функціональну активність білків, вони можуть виявитися дуже корисними й при встановленні структури білкових молекул. Мабуть, найбільш показовим прикладом у цьому відношенні є одержання впорядкованих мембранних препаратів, придатних для аналізу третинної структури білка.

Використання реконструйованих мембран для вивчення структури білків. Структурні дані про мембранні білки з роздільною здатністю, необхідною для встановлення просторового розташування поліпептидного ланцюга, можна одержати тільки за допомогою дифракційних методів. Ці методи вимагають наявності регулярно повторюваних білкових структур. За допомогою методів, заснованих на дифракції світла чи електронів,

можна вивчати лише двовимірні мембранні кристалічні решітки, та й то за низької роздільної здатності. Для рентгеноструктурного ж аналізу з високою роздільною здатністю необхідні тривимірні кристали.

Таблиця 8. Методи, які застосовуються для аналізу зв'язування лігандів солюбілізованими білками [7]

Метод	Пояснення
Гель-фільтрація	Процедура довготривала. Непридатна для великої кількості зразків. Детергент може вплинути на розділення
Фільтрація	Швидкий метод. Дозволяє аналізувати багато зразків. Непридатний в умовах швидкої дисоціації ліганду ($t < 15$ с). Існує широкий спектр різних фільтрів
Ультрацентрифугування	Процедура довготривала. Можна аналізувати тільки обмежену кількість зразків. Можливе захоплення незв'язаного ліганду (однак центрифугуванням через шар олії можна знизити його рівень до мінімального)
Рівноважний діаліз	Процедура довготривала. Дозволяє проводити вимірювання в умовах рівноваги
Проточний діаліз	Швидкий метод. Дозволяє змінювати концентрацію ліганду в одному зразку в широких межах. Утруднення зазвичай викликає неспецифічне зв'язування ліганду
Осадження поліетиленгліколем	Швидкий метод. Дозволяє використовувати фільтрування або центрифугування
Імунологічні методи	Необхідні специфічні антитіла

Двовимірні кристали на основі реконструйованих мембран вдалося одержати для бактеріородопсину й для світлозбиральних комплексів хлорофіл *a/b*. Попередні дослідження показали, що можна виростити тривимірні мікрокристали реконструйованого ацетилхолінового рецептора [73].

Цінність використання реконструйованих мембран у дослідженнях структури білків очевидна, проте здійснити успішну кристалізацію (двовимірну або тривимірну) нелегко, оскільки це залежить від багатьох факторів: типу й концентрації детергента, присутності невеликих амфільних молекул (необхідні для заповнення порожнеч у кристалічних решітках), фазового стану мембранних ліпідів. Вбудовування очищеного білка в ліпід певного типу не тільки спрощує досліджувану систему, але й дозволяє змінювати, ймовірно, найбільш важливі для мембранних білків умови, а саме – властивості межі розділу фаз. Інша перевага використання реконструкції для кристалізації мембранних білків полягає в тому, що мембрани, які в нативному стані утворюють везикули, за низького співвідношення ліпід/білок часто формують незамкнені пластинки. Реконструкція зображення спрощується, коли існує тільки один шар упорядкованого білка.

Нижче описано метод, застосований для одержання високовпорядкованих решіток реконструйованого мембранного білка. Світлозбиральні комплекси хлорофілу *a/b* виділяли із сіянцив гороху в 1,5 % (о/о) тритоні X-100 й включали їх в азолектинові везикули методом заморожування–відтаювання. Надлишок тритону X-100 видаляли адсорбцією на смолі біобідс SM-2 та індукували утворення решіток інкубацією мембран з $MgCl_2$ (2 ммоль/л). Мембрани фракціонували у градієнті сахарози (0–40 %, в/о) у буфері, що містить 0,03 % тритону X-100. Наявність невеликої кількості детергента полегшує видалення надлишку ліпиду й сприяє включенню контрастуючого реагенту в ліпідну фазу. Реконструйовані мембрани центрифугували за 95 000 г упродовж 20 год, сахарозу видаляли діалізом або знижували її концентрацію розведенням і виділяли двовимірні кристали чи везикули центрифугуванням. Для електронно-мікроскопічного дослідження препарат контрастували 2 % (в/о) розчином ураніацетату. Реконструкція зображення за електронною мікрофотографією дала тривимірну структуру білків з роздільною здатністю 30 Å.

Незважаючи на великі успіхи, досягнуті мембранною біологією на всіх напрямках, як і раніше залишається справедливим (якщо не цілком, те принаймні частково) зауваження, що в царині реконструкції дослідники не мають загальної керівної ідеї, яка могла б забезпечити вирішення завдань, що постають знову і знову. На сьогодні неможливо ні рекомендувати який-небудь універсальний детергент, що є придатним для солюбілізації будь-яких мембранних білків, ні запропонувати таку методику реконструкції, яка виявилася б успішною щодо всіх білків [7].

2.6. ВПЛИВ ЛІПІДІВ НА АКТИВНІСТЬ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ

Каталітична активність багатьох мембранних ферментів залежить від ліпідів, які можуть виконувати дві функції: 1) створювати необхідне середовище; 2) діяти як алостеричний регулятор, що модулює активність ферменту. У першому випадку ліпіди не тільки запобігають денатурації ферментів, але й полегшують взаємодію ферментів один з одним та з іншими мембранозв'язаними компонентами, зокрема, з ліпофільними субстратами. Виступаючи як алостеричні ефектори, ліпіди активують фермент здебільшого шляхом стабілізації його в конкретній конформації. Узагалі, ці дві функції є зовсім різними, проте розподілити їх експериментально буває надто важко. В ідеальній експериментальній системі алостеричним ефектором має бути специфічний ліпід, а необхідне для роботи оточення ферменту повинно створюватися всією основною масою ліпідів у бішарі. На жаль, поки що знайдений тільки один приклад абсолютної специфічності ферменту до певного ліпиду. β -гідроксидибутирату для вияву каталітичної активності потрібен тільки фосфатидилхолін, у більшості ж випадків ферменти достатньо ефективно активуються різ-

ними ліпідами. Оскільки будь-який ліпід може так чи інше виконувати як функцію оточення, так і функцію специфічного алостеричного ефектора, розпізнати ці два ефекти стає практично неможливо. На ферментну активність може впливати також фізичний стан бішару, зокрема, поверхнева густина заряду та в'язкість. Систематично підбираючи ліпіди різної структури та змінюючи фізичні стани мембрани, можна встановити кореляцію між активністю ферменту й цими параметрами, але лише таке дослідження ще не дозволяє розмежувати дві функції ліпідів. Зміна фізичного стану бішару може вплинути на взаємодію із ферментом різних ліпідів, у тому числі й тих, що функціонують як алостеричні ефектори. При вивченні ферментів, субстратами яких є ліпофільні сполуки, виникають особливі проблеми, оскільки такі субстрати має бути включені в бішар до чи після отримання везикул, а великі концентрації субстрату, розчиненого у бішарі, не можуть вплинути на фізичний стан модельної мембрани.

Під час дослідження впливу ліпідів на мембранні ферменти використовується ще одна стратегія – так званий *метод змішаних міцел* [18]. Фермент розчиняють у детергенті, який його не активує, й до суміші додають ліпіди. Багато мембранних ферментів зберігають певну активність і в детергенті, до того ж така активність великою мірою залежить не тільки від природи ферменту, але й від обраного детергента, а також, можливо, від присутності ендогенних ліпідів у препараті очищеного ферменту. Узагалі, для методу змішаних міцел бажано повністю звільнити фермент від ліпиду, проте для цього іноді доводиться використовувати надто жорсткі процедури, які можуть привести до денатурації білка. Методи повного знежирення базуються на пропусканні препарату ферменту крізь середовище з великим надлишком детергента. Для цього використовують гель-фільтрацію, центрифугування у градієнті густини сахарозі або зв'язування ферменту з яким-небудь твердим носієм (наприклад, ДЕАЕ-сефарозою) із наступним промиванням надлишком детергента.

Метод змішаних міцел має ще й ті переваги, що ліпофільний субстрат можна додавати до міцел того самого детергента, хоч у цьому разі можуть виникнути труднощі, пов'язані з просторовим розподілом ферменту й субстрату. Ефекти ліпідів, які спостерігаються в таких системах, є переважно алостеричними, тому що тут немає бішару, а зв'язування ліпідів з білком відбувається у глобулярній міцелі у присутності великої кількості детергента. На жаль, фізичний стан комплексу фермент–детергент–фосфоліпід визначити практично неможливо, і це є серйозним недоліком описаного підходу.

Будь-які ефекти, які спостерігаються в такій системі для якого-небудь ліпиду, мають бути досягнуті з використанням кількох детергентів, які не активують фермент. Тільки в цьому разі можна бути впевненим, що детергент є нейтральним.

Результати досліджень багатьох систем дозволяють зробити такі загальні висновки.

1. Для активації ферменту дуже рідко є необхідним ліпід з якоюсь чітко визначеною структурою. Безперечно, деякі ліпіди активують даний

фермент з більшою ефективністю, на відміну від інших, проте така перевага може залежати від умов вимірювання, і тому робити висновок про його фізіологічне значення, як мінімум, передчасно.

Цілком може статися так, що ліпід, який з високою ефективністю активує фермент, взагалі відсутній у мембрані, з якої цей фермент отримано. Тому до тверджень щодо специфічності ліпиду слід ставитися з обережністю.

2. Вимірювана в системі зі змішаними міцелами залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації ліпиду свідчить про високу кооперативність процесу. Таку поведінку можна пояснити, зокрема, тим, що ліпіди зв'язуються некооперативно з кількома еквівалентними центрами на ферменті, але активними є тільки ті молекули ферменту, в яких зайнята більша частка ліпідзв'язуючих центрів. Нерідко під час активації ферменту ліпідом спостерігається оптимум у концентраційній залежності, пов'язаний, можливо, з досягненням певного співвідношення між ліпідом і детергентом та формуванням у такій суміші конкретних структур.

3. Сама по собі бішарова структура не є необхідною для активації ферментів, тому що багато ферментів виявляють активність у присутності детергента або у складі ліпідно-детергентних міцел. Відомі випадки, коли мембранні ферменти активуються ліпідами, які взагалі не формують стабільні бішари.

4. Важливим параметром, який визначає активність більшості мембранних ферментів, безумовно, є фізичний стан бішару. Проте чітких даних про фізіологічну регуляцію ферментативної активності за допомогою цього параметра *in vivo* немає. Під час переходу ліпідів у фазу гелю багато ферментів стають неактивними, або їхня активність різко зменшується. У літературі наведено багато прикладів, коли зміни швидкості реакції ферменту з температурою корелювали зі змінами фізичного стану ліпідів. У цих роботах головна увага привертається до кореляції між точками перегину в температурних залежностях ферментативної активності та якою-небудь характеристикою, що відображує фізичний стан ліпиду (наприклад, анізотропією флуоресценції зв'язаного барвника). Виявити зв'язок ферментативної активності з в'язкістю мембрани, виходячи з температурної залежності, дуже непросто, тому що температура впливає одночасно на багато параметрів. Слід мати на увазі, що в'язкість мембрани значною мірою корелює з густиною упакування молекул ліпиду в бішарі, тому зміни в'язкості, що індукуються температурою, можна пояснити взагалі змінами у густині упакування. Існує небагато прикладів чіткої лінійної кореляції між активністю ферменту й в'язкістю мембрани. Незрозуміло, як інтерпретувати таку кореляцію щодо механізму ферментативної реакції. Лише в деяких роботах містяться вказівки на те, яка або які зі стадій ферментативної реакції є лімітуючими й модулюються зв'язуванням ліпиду. У зв'язку із цим слід згадати про те, що ліпіди можуть значною мірою впливати не тільки на максимальну швидкість, але й на зв'язування ферменту із субстратами й кофакторами.

5. Узагалі, під час дослідження взаємодії з певним ферментом великої кількості різних ліпідів кореляції між активністю ферменту та яким-небудь параметром (наприклад, в'язкістю) не спостерігається. Поки ліпід перебуває в рідинно-кристалічному стані, для ферментативної активності більш важливою є структура полярної голівки ліпиду, ніж в'язкість бішару. Інакше кажучи, важливою є хімічна структура індивідуальних ліпідів.

Нижче розглянуто п'ять ліпідозалежних ферментів, які є, по-перше, найкраще вивченими та охарактеризованими; по-друге, охоплюють кілька типів мембранних ферментів; по-третє, можуть бути ілюстрацією кількох основних проблем, що виникають під час досліджень ліпідозалежної активації.

β -гідроксибутиратдегідрогеназа (БДГ). Це один з найбільш вивчених ферментів, що активується ліпідом, для якого характерна абсолютна специфічність до конкретного ліпиду; активувати БДГ здатен тільки фосфатидилхолін. БДГ локалізується всередині внутрішньої мітохондріальної мембрани й каталізує окиснення β -гідроксибутирату за допомогою NAD^+ [17]. Обидва субстрати є водорозчинними. Молекулярна маса субодиниці ферменту дорівнює 31 кДа, але її амінокислотну послідовність до кінця не встановлено. Одержаний після очищення фермент вільний від фосфоліпиду й детергента і здатен спонтанно вбудовуватися у фосфоліпідні везикули міцелоутворення. Хоч БДГ зв'язується і з везикулами, які не містять фосфатидилхоліну, каталітичну активність фермент починає виявляти тільки у присутності фосфатидилхоліну. Під час вбудовування ферменту у везикулу, ймовірно, відбувається не тільки взаємодія з поверхнею мембрани, але й значне занурення білка в бішар, а також зміни конформації білка. Кінетичні властивості ферменту та його тетрамерної форми однакові в мітохондріальній мембрані та після реконструкції з мітохондріальними ліпідами.

Було вивчено активацію БДГ фосфоліпідними везикулами, які містять різну кількість фосфатидилхоліну [18]. У всіх випадках фермент є вбудованим у ліпосоми; залежність швидкості ферментативної реакції від вмісту фосфатидилхоліну в бішарі вказує на високу кооперативність процесу, в якому беруть участь два необхідні для активації ліпідзв'язуючих центри. Крім того, за даними про гасіння флуоресценції триптофану похідними фосфатидилхоліну окремо було визначено доступність молекул фосфатидилхоліну для БДГ. Ступінь гасіння флуоресценції фактично є мірою зв'язування ліпиду. Виявляється, що фосфатидилхолін зв'язується некооперативно приблизно з 12 центрами в молекулі ферменту. Таке кооперативне зв'язування з досить значною кількістю центрів є надто типовим для мембранних білків у бішарі. Крім того, переважна частина флуоресценції гаситься за більш низьких концентрацій фосфатидилхоліну, ніж необхідно для активації. Таку розбіжність між зв'язуванням ліпиду й активацією ферменту можна пояснити, якщо зробити припущення, що в активації бере участь тільки дуже невелика частка центрів, які неможливо виявити в експериментах з гасіння флуоресценції. Наведені результати є

цікавими ще й тому, що вони дозволяють порівняти фізичну взаємодію певного ліпиду й ферменту з біохімічною відповіддю (активацією).

Інтерпретація результатів таких експериментів ускладнюється тим, що активність ферменту може значною мірою залежати від ступеня його агрегації, тобто активність ферменту в різних ліпідах, можливо, відповідатиме ступеню його дезінтеграції. Цікавою особливістю БДГ є також те, що він є одним з небагатьох ферментів, які активуються коротколанцюговими гомологами фосфатидилхоліну, що зв'язуються із ферментом та активують його в концентраціях нижче критичної. Ці дані також підтверджують, що до процесу активації ліпідом залучена тільки невелика кількість центрів зв'язування на білку.

Піруватоксидаза. Ця флавінмісна дегідрогеназа *E. coli*, що каталізує окиснення пірувату до оцтової кислоти й CO_2 та відновлення убіхінону в цитоплазматичній мембрані, забезпечує надходження електронів в аеробний дихальний ланцюг. Фермент має низку характерних особливостей. Він розчиняється у воді й не виявляє ніяких притаманних мембранному білку властивостей. Проте у присутності субстрату й кофактора (тіамінпірофосфату) відбуваються зміни конформації білка, внаслідок чого формується центр зв'язування з мембраною. За таких умов різко зростає спорідненість ферменту з детергентом й фосфоліпідних везикул, і білок за своїми властивостями стає схожим на справжній мембранний препарат. Піруватоксидаза може бути прикладом ферменту, який є цитоплазматичним, поки субстрату мало, але перетворюється на мембранний, як тільки концентрація субстрату стає досить високою.

Найбільш цікавим під час дослідження цього ферменту є його ефективна активація ліпідами. Активність ферменту можна визначити, використовуючи замість природного мембранозв'язаного акцептора – убіхінону будь-який розчинний у воді штучний акцептор електронів, наприклад, фериціанід. У присутності ліпідів каталітична активність піруватоксидази зростає в 50 разів. На відміну від β -гідроксибутиратдегідрогенази цей фермент активується різними фосфоліпідами й детергентами. За концентрацій, нижчих за критичні концентрації міцелоутворення, фермент повністю активується як аніонними, так і катіонними детергентами, а дослідження зв'язування детергентів показує, що в активації бере участь дуже невелика кількість центрів зв'язування. Зв'язування ферменту із фосфатидилхоліновими везикулами або детергентами не відбувається, доки не буде додано субстрат і кофактор. У присутності субстрату й кофактора піруватоксидаза здатна зв'язуватися й активуватися різними везикулами, отриманими з багатьох фосфоліпідів. Зв'язування відбувається, в першу чергу, за рахунок гідрофобних, а не електростатичних взаємодій. Зв'язування ліпиду й активація у випадку піруватоксидази, ймовірно, є процесами нероздільними, хоч і не всі везикули зв'язаного фосфоліпиду або амфіфільної сполуки відповідають за активацію ферменту. Активація ліпідами викликає зміни у спектрі поглинання зв'язаного флавіну, можливо, внаслідок перебігу реакції перенесення електронів.

Конформаційні зміни в молекулі піруватоксидази приводять не тільки до утворення ліпідзв'язуючого домену, але й до появи чутливої до протеаз ділянки ланцюга поблизу С-кінця. Протеоліз пригнічує зв'язування ліпідів, але, як це не дивно, викликає активацію ферменту по відношенню до реакції відновлення водорозчинних штучних акцепторів електронів. Активований протеазами фермент, проте, вже не може відновлювати мембранозв'язаний убіхінон, оскільки втрачає здатність зв'язуватися з мембраною.

Як свідчать результати клонування й секвенування гена, що кодує піруватоксидазу, амінокислотна послідовність білка не має довгих гідрофобних ділянок. Генетичні дослідження, а також дані протеолізу показали, що за зв'язування ліпиду відповідає ділянка поліпептиду, локалізована поблизу С-кінця. На цій ділянці є коротка потенціально амфіфільна α -спіраль, яка може брати участь у зв'язуванні з поверхнею бішару. Отриманий мутантний штам *E. coli*, в якого піруватоксидаза позбавлена останніх 24 амінокислотних залишків. Такий фермент повністю неактивний *in vivo*, але *in vitro* успішно каталізує реакцію з водорозчинним акцептором електронів. Приблизно такий мутантний варіант піруватоксидази не здатен зв'язуватися з мембраною навіть за високих концентрацій субстратів, і отже, не окиснюється убіхіноном. Приведене дослідження є гарним прикладом того, як дані про зв'язування ліпиду й активацію, отримані *in vitro*, можна з успіхом використовувати для пояснення механізму функціонування ферменту у клітині.

Як піруватоксидаза, так і β -гідроксибутиратдегідрогеназа можуть активуватися або під час зв'язування з невеликою кількістю молекул амфіфільної сполуки, або під час зв'язування з поверхнею бішару. В останньому разі деяка частка білка проникає всередину мембрани. Обидва розглянуті приклади чітко ілюструють роль фосфоліпідів як алостеричних регуляторів.

Ca²⁺-АТФаза (див. також розділ 1, 2.3.2). Якщо попередні два приклади ілюструють роль ліпідів як алостеричних ефекторів мембранних білків, то Ca²⁺-АТФаза і ще два ферменти, розглянуті нижче, є прикладами ферментів, на активність яких впливають структура ліпиду й фізичний стан бішару [70]. Виділена із саркоплазматичного ретикулума скелетних м'язів Ca²⁺-АТФаза складається тільки з одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою 115 кДа. Фермент здійснює активний транспорт Ca²⁺ всередину саркоплазматичного ретикулума, знижуючи тим самим концентрацію Ca²⁺ в цитоплазмі під час релаксації м'яза. На кожну гідролізовану молекулу АТФ крізь мембрану переносяться два іони Ca²⁺, а реакція є електрогенною, тобто перенесення зарядів через бішар створює трансмембранний електричний потенціал. (Структуру Ca²⁺-АТФази й передбачуваний механізм іонного транспорту розглянуто в у 2.3.2).

У процесі дослідження в деяких лабораторіях ізольований фермент було повністю знежирено й реконструйовано із значною кількістю ліпідів і ліпідних сумішей. Активність Ca²⁺-АТФази, як і багатьох мембранних фе-

рментів, залежить від в'язкості та хімічної природи оточуючих ліпідів. Змінюючи фосфоліпідний склад везикул, в які вбудований фермент, можна впливати на його активність. Чим вища плинність (величина, обернена в'язкості) ліпідного бішару ліпосом, тим вища швидкість гідролізу АТФ. При зміні температури одночасно змінюються плинність ліпідного бішару у везикулах й активність АТФази [15]. Оскільки до зміни в'язкості бішару є чутливими тільки ті ферменти, які при роботі змінюють свою конформацію, припускають, що з усіх стадій ферментативної реакції перенесення АТФ із зростанням в'язкості ліпідів зменшується швидкість розпаду фермент-фосфатного комплексу Ca^{2+} -АТФази. Це відбувається внаслідок того, що на цій стадії мають місце рухи ділянки ферменту, що пов'язано з перенесенням кальцію крізь мембрану.

Вивчення залежності активності АТФази від кількості сполученого із ферментом ліпиду за відсутності детергентів показало, що для повної активації на одну молекулу АТФази має припадати 30 молекул фосфоліпиду. Ця кількість, за оцінками, достатня, щоб створити навколо кожної молекули білка фосфоліпідний моношар. Така прямолінійна інтерпретація цих даних, мабуть, не є правомірною, тому що нам невідомий фізичний стан такої суміші. За результатами цієї роботи було запропоновано концепцію пограничних (або анулярних) ліпідів, тобто ліпідів, які безпосередньо межують з білком. Критичним фактором, що визначає ферментативну активність, за цією концепцією, має бути ліпідний склад цього анулярного шару. Відсутність впливу холестеролу, включеного до фосфоліпідно-білкових комплексів, передбачає, що холестерол не входить до анулярного шару, проте відповідні дані щодо його зв'язування показали, що це не так. Узагалі, завдяки одним лише кінетичним даним зрозуміти механізм зв'язування ліпиду досить важко.

Na^+, K^+ -АТФаза (див. також розділ 1, 2.3.1). Цей фермент каталізує АТФ-залежний транспорт іонів Na^+ та K^+ крізь плазматичну мембрану клітин тварин. На кожну молекулу гідролізованого АТФ з клітини виводяться три іони Na^+ та надходять два іони K^+ . Фермент є електрогенним іонним насосом, що генерує трансмембранний потенціал [76]. Na^+, K^+ -АТФаза виділена в чистому вигляді з кількох джерел. Вона завжди складається з двох субодиноць: великої каталітичної субодиноці (α , молекулярна маса 111 кДа) і малої, яка є глікопротеїном (β , молекулярна маса 55 кДа). Функція β -субодиноці не є відомою. Повністю амінокислотні послідовності обох субодиноць відомі для Na^+, K^+ -АТФази з нирок вівці та з електричного органу ската *Torpedo californica*. Каталітична субодиноця, гомологічна Ca^{2+} -АТФазі, також утворює значну кількість трансмембранних спіральних ділянок (виходячи з профілю гідропатичності). β -субодиноця, мабуть, також перетинає мембрану. Можливо, трансмембранним є і єдиний спіральний сегмент. (Більш докладно структуру й механізм дії ферменту розглянуто в 2.3.1).

Функціонуючою формою ферменту, швидше за все, є або гетеродимер $\alpha\beta$, або тетрамер $(\alpha\beta)_2$. Дослідники поки що не прийшли до єдиної

думки відносно мінімальної одиниці, необхідної для іонного транспорту. Очищений фермент вдалося реконструювати з багатьма фосфоліпідами, але для поновлення активності найбільш ефективними є фосфатидилсерин і фосфатидилгліцерол. Причина цього невідома, але фермент у бішарі міцніше зв'язується з кислотними фосфоліпідами. Ліпідне оточення впливає не тільки на каталітичну активність, але й на чутливість ферменту до специфічного інгібітора оубаїну [46].

Для реконструкції Na^+, K^+ -АТФази в першу чергу важливою є структура полярних голівок фосфоліпідів, але певну роль, очевидно, відіграє і в'язкість бішару. Про це свідчать результати експериментів з виявлення змін в'язкості ліпідів за умов збільшення гідростатичного тиску у препаратах плазматичної мембрани, які містять фермент. Високий тиск стабілізує систему в конфігурації з мінімальним об'ємом, тому за підвищення гідростатичного тиску вільний об'єм і в'язкість бішару зменшуються (тобто збільшується густина упаковки ліпідних молекул). Між ферментативною активністю й в'язкістю мембрани, яка вимірюється за ступенем анізотропії флуоресценції мембранних зондів, спостерігається чітка кореляція. Вважають, що зміни властивостей бішару під час підвищення тиску зумовлюють стабілізацію конкретних конформаційних станів ферменту у процесі каталітичного циклу, що впливає на лімітуючу стадію (або стадії) сумарної реакції. Неможливо, проте, відкинути й інше пояснення: тиск впливає на фермент безпосередньо, а не опосередковано через ліпід. Утім, ці експерименти важливі вже тим, що вони демонструють можливість зміни фізичного стану мембрани під дією гідростатичного тиску.

Переносник глюкози. Як і попередні два ферменти, цей білок бере участь у транспорті, але не в активному транспорті іонів, а в полегшеній дифузії. Переносник глюкози каталізує транспорт цукру за градієнтом концентрації крізь мембрану еритроцитів. Він являє собою глікопротеїн молекулярною масою 55 кДа [94]. Виходячи з первинної структури переносника, можна уявити, що він має 12 трансмембранних спіральних доменів. Його вдається реконструювати у везикули з різноманітних ліпідів і ліпідно-холестеролових сумішей. Як показують результати експериментів з реконструкції, для реалізації каталітичної функції білка найважливішим фактором є структура полярної голівки фосфоліпіду, а до найменш суттєвих належать в'язкість бішару або параметр упорядкованості. Ліпід впливає як на максимальну швидкість, так і на спорідненість ферменту із цукром (K_M). Вражає, проте, той факт, що на максимальну швидкість реакції цього переносника взагалі не впливає температурний фазовий перехід ліпідів з рідкокристалічного стану в гель (лише в тому випадку, коли переносник реконструйований із фосфатидилгліцеролом, але не з фосфатидилхоліном).

Таким чином, на сьогодні накопичено багато даних про структуру біологічних мембран і розроблено різноманітні методи для вивчення їх функціонування.

3. МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ КЛІТИННИХ МЕМБРАН

Сьогодні за допомогою сучасних біохімічних методів може бути виділено різноманітні субклітинні структури, що є необхідним для докладного вивчення їхніх специфічних функцій. Для отримання клітинних органел у чистому вигляді насамперед необхідно зруйнувати клітину без порушення структурної та функціональної організації її мембран.

3.1. МЕТОДИ РУЙНУВАННЯ КЛІТИН І ТКАНИН

Для руйнування клітин і тканин було розроблено численні методи: осмотичний шок, дія ультразвуку, заморожування та відтаювання, зниження тиску в інертному газі, механічне розтирання чи розбивання тканини (гомогенізація) [24].

Ізольовані клітини, особливо клітини в культурі, зазвичай погано піддаються руйнуванню, з них важко отримати субклітинні фракції із задовільним виходом. Тому для руйнування таких клітин найчастіше застосовують *гомогенізацію* (наприклад, у гомогенізаторі Даунса малого об'єму (5–12 мл) із щільно підігнаним товкачем), під час якої клітина руйнується під дією сил тертя [7]. При гомогенізації є дуже важливим підібрати тип гомогенізатора: чим міцніша тканина, тим вищою має бути механічна ефективність гомогенізатора. Для гомогенізації таких тваринних тканин, як печінка, нирки, кора надниркових залоз і мозок можна використовувати гомогенізатори Поттера з механічним приводом, що складається із скляної пробірки зі щільно підігнаним товкачем із скла або тефлону [8]. Ще одним засобом гомогенізації є розтирання тканин за допомогою товкача у ступці з піском або скляними намистинками.

При проведенні гомогенізації необхідно також ретельно підбирати оптимальні значення рН, склад буфера та його осмотичний тиск. Найчастіше використовують суспендуючий розчин, що містить розчин сахарози (0,25 моль/л), $MgCl_2$, а також відновники, зокрема дитіотреїтол, β -меркаптоетанол та ін. [33]. Методом гомогенізації доцільно руйнувати клітини, які попередньо зазнали гіпотонічного шоку (для цього їх інкубують упродовж 10 хв за 4 °C у гіпотонічному розчині трис-HCl (5 ммоль/л, рН 7,6) [8].

Для руйнування клітин у культурі більш придатними є методи, що базуються на кавітації газів. Для цього клітинну суспензію заливають у металічний циліндр, заповнений азотом, і витримують упродовж 5–30 хв під високим тиском (7–65 атм). При швидкому зниженні тиску до рівня атмосферного відбувається вивільнення розчиненого в цитоплазмі азоту; суспензія швидко виділяється крізь вузький канал, і в результаті кавітації газу клітини руйнуються [7]. За певних умов плазматична мембрана та

ендоплазматичний ретикулум утворюють малі везикули, а органели залишаються інтактними.

Методом, який не можна стандартизувати, є обробка клітин ультразвуком. За допомогою цього методу було зруйновано тучні клітини, причому для здобуття оптимального результату необхідно підібрати певні параметри (безперервна або імпульсна обробка) [48].

Більшість органел і мембранних структур після виділення продовжують руйнувати, щоб отримати субфракції, які може бути розділено у градієнті густини сахарози. Наприклад, при гомогенізації плазматичних мембран клітин печінки гомогенізатором Даунса можна отримати везикули жовчних каналців і компоненти, що містять ділянки мембранних контактів. Ці фракції легко розділяються за густиною у градієнті сахарози [7].

3.2. РОЗДІЛЕННЯ СУБКЛІТИННИХ КОМПОНЕНТІВ

Методи розділення субклітинних компонентів переважно базуються на різниці швидкості седиментації, яка визначається розміром і формою частинок, та густини.

Швидкість седиментації сферичних частинок залежить від їхньої густини та радіуса, а також від в'язкості середовища суспендування. Час, необхідний для осадження сферичної частинки в рідкому середовищі від меніска рідини до дна центрифужної пробірки, є зворотно пропорційним швидкості седиментації й визначається таким рівнянням:

$$t = \frac{q}{2} \cdot \frac{\omega^2 \cdot r^2 \cdot r_D}{\omega^2 \cdot r^2 \cdot (c_r - c) \cdot r_M},$$

де t – час седиментації; q – прискорення; ω – кутова швидкість ротору; η – в'язкість середовища; r – радіус частинки; ρ_r – густина частки; ρ – густина середовища; r_M – відстань від осі обертання до меніска рідини; r_D – відстань від осі обертання до дна пробірки.

Оскільки біомембрани мають питому густина у межах 1,05–1,25, то при центрифугуванні їх можна відокремити від білків (питома густина 1,3), глікогену (питома густина 1,63), ДНК (питома густина 1,7), РНК (питома густина 2,00) і рибосом (питома густина 1,71) [20]. Тому для тонкого розділення біологічних мембран застосовують *диференційне центрифугування* у градієнті густини.

У процесі ультрацентрифугування гомогенатів клітин і тканин фрагменти мембран рухаються під дією відцентрової сили й розподіляються вздовж центрифужної пробірки. Якщо цей розподіл не змінюється із часом, вважається, що фрагменти мембран досягли седиментаційної рівноваги, за якою можна зробити висновок про масу й густина фракцій [33].

Речовина, що використовується для приготування градієнта, має бути легко розчиненою у воді, фізіологічно нешкідливою та хімічно інертною; його розчин має бути невязким, прозорим у видимій ділянці спект-

ра, а також має створювати низький осмотичний тиск [7]. Розчин *сахарози* задовольняє більшість вказаних вимог, проте за високих концентрацій має велику в'язкість і може викликати небажані осмотичні ефекти, що обмежує його використання для виділення субклітинних структур.

Крім сахарози, для створення градієнтів густини застосовуються інші матеріали, зокрема *перкол* (Percol), що являє собою золь силіконових частинок, вкритих полівінілпіролідом [7]. Він дозволяє зменшити швидкість центрифугування й створити ізоосмотичні умови при виділенні клітин і субклітинних часток, що є важливим при ізолюванні крихких органел і везикул для досліджень мембранного транспорту.

Метризамід (Metrizamide) та *найкодєнз* (Nykodenz), розчини яких мають більш низьку осмотичну активність і в'язкість, ніж розчини сахарози з близькою густиною, використовуються для розділення мітохондрій, лізосом і пероксисом, а також для виділення секреторних гранул, що зберігають транспортну активність.

Процедура виділення починається з гомогенізації клітин у розчині, що містить шари, буфер і сахарозу, яка, створюючи осмотичний тиск, запобігає руйнуванню виділених мікроструктур. Для розділення різних субклітинних структур варіюють швидкість і час центрифугування, що дозволяє отримати три фракції: *ядерну*, в якій містяться великі за розміром органели; *мітохондріальну* (містяться великі органели); *мікросомальну* (найменші органели). Потім кожну з отриманих фракцій нашаровують на градієнт густини й центрифугують відповідно до густини й швидкості седиментації впродовж різних проміжків часу. У рис. 16 наведено схему отримання субклітинних фракцій на прикладі клітин печінки.

Отже, основні компоненти клітини осаджують у такій послідовності: цілі клітини та їхні фрагменти, ядра, мітохондрії, лізосоми, мікротільця, мікросоми (в основному фрагменти гладенького та шорсткого ендоплазматичного ретикулума, плазматична мембрана тощо), окремі компоненти мембранних структур [33].

Для отримання "порожніх" субклітинних структур, тобто виключно мембранних фракцій, виділені субклітинні структури обробляють ультразвуком. При цьому вміст органел виходить назовні, а мембрани знову утворюють замкнені структури [20].

Після розділення можна дослідити велику кількість ферментів. Тобто чистоту виділених фракцій визначають за активністю ферментів, що містяться в даній фракції. Деякі ферменти рухаються групами з певною швидкістю й концентруються в деяких ізопікнічних точках, що дозволяє ідентифікувати органели відповідно до їхньої густини, коефіцієнту седиментації та розподілу ферментів [8].

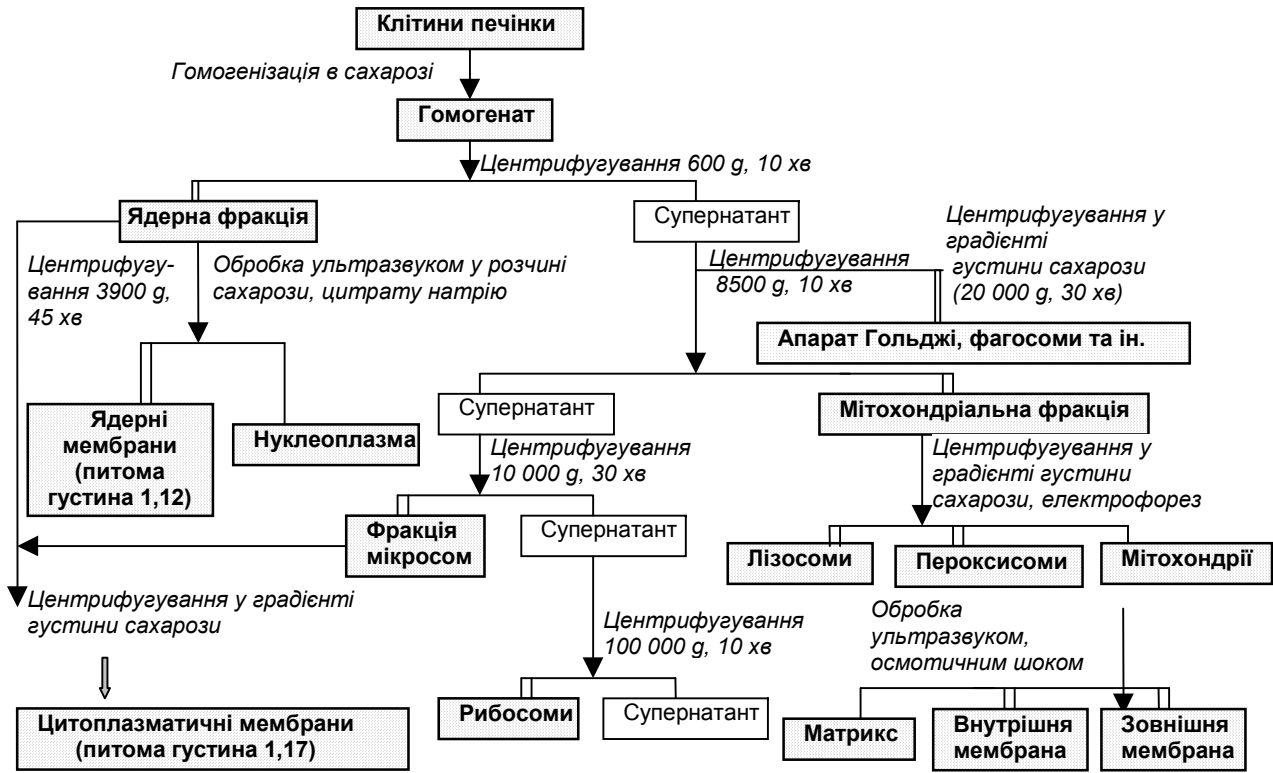


Рис 16. Схема виділення біологічних мембран [20]

Морфологічні особливості кожної фракції можна визначити за допомогою електронної мікроскопії. Потім підраховують вміст у відсотках кожного класу органел в цих фракціях та у вихідному гомогенаті. Таким чином можна отримати повні дані про кількісне співвідношення органел у тканині.

Якщо ферменти виявити неможливо, чистоту виділених мембран можна характеризувати за рівнем вмісту ферментів, що належать іншим, сусіднім фракціям, тобто за забрудненням іншими фракціями. Наприклад, для ідентифікації апарату Гольджі використовують здатність цієї мікроструктури синтезувати ліпопротеїни низької густини при поглинанні спиртів [20]. Клітинні стінки й базальні мембрани відокремлюються завдяки їхній великій питомій густині порівняно з внутрішньоклітинними структурами.

Подальша доля біомембран, тобто результати фракціонування отриманих при гомогенізації фрагментів мембран відповідно до їхньої структури, залежить від способу руйнування клітин, складу середовища й типу клітин. Якщо вміст клітини виходить крізь один розрив у мембрані, то в результаті утворюються порожні мішечки, або тіні. Такі тіні можуть утворювати невеликі пухирці, які, з'єднуючись, захоплюють деякі частинки.

Якщо діаметр цих пухирців більше 4 мкм, то їх можна відрізати від менших за розміром цитоплазматичних пухирців, що дозволяє морфологічно ідентифікувати поверхневу мембрану [8]. Якщо в результаті руйнування утворюються пухирці діаметром менше 2 мкм, то їх морфологічна модифікація є неможливою, й необхідно застосовувати біохімічні маркери.

З усіх внутрішньоклітинних органел найлегше ідентифікуються мітохондрії та ядра. Ізопікнічні точки мітохондрій є відносно постійними в різних тканинах і, як правило, вищі, ніж аналогічні точки поверхневих мембран клітин. У великих мембранних фрагментів швидкості седиментації більш високі, ніж у мітохондрій, а у везикулярних мембран – більш низькі. Мітохондрії різних тканин мають одні й ті самі маркерні ферменти.

3.3. ВИДІЛЕННЯ РІЗНИХ КЛІТИННИХ ОРГАНЕЛ

Існує загальний підхід до виділення субклітинних мембран, де з одного тканинного гомогенату отримують різні мембрани та органели. Наприклад, гомогенат печінки щура є джерелом плазматичних мембран, ендоплазматичного ретикулама й мембран апарату Гольджі [62], ентероцити кроля – джерелом щіткової облямівки, базолатеральних плазматичних мембран, гладенького та шорсткого ендоплазматичного ретикулама та мембран апарату Гольджі. Проте за таких схем виділення, як правило, доводиться приймати компромісні рішення відносно чистоти фракцій, якої можна досягти. Тому для отримання бажаних фракцій клітинних органел необхідно вибирати специфічні середовища, засоби гомогенізації та розділення. На рис. 16 наведено схему виділення біологічних мембран з клітин печінки.

3.3.1. Виділення ядер та ядерних мембран

Ядра є великими крихкими органелами, що складаються з ядерної оболонки, хроматину, ядерця та різних гранул. Розроблено прийоми, які дозволяють мінімізувати руйнування ядер з наступним вивільненням хроматину, який під час субклітинного фракціонування прикріплюється до інших компонентів, переважно до плазматичної мембрани. Тканини диспергують у гомогенізаторах з великим зазором (0,12–0,16 мм) у середовищі, що містить сахарозу (0,32 моль/л) і $MgCl_2$ (1 ммоль/л) [7].

Зовнішня ядерна мембрана, що вкрита рибосомами, при виділенні може зазнавати протеолізу. Проте, якщо проводити екстракцію за високої іонної сили, можна отримати непошкоджені ядерні оболонки, які лише слабо забруднені гістонами та ДНК [77].

Усі відомі підходи до виділення ядерних оболонок починаються з отримання очищених клітинних ядер. Зазвичай їх усувають шляхом центрифугування за малих швидкостей за допомогою солюбілізації в гіпотонічному розчині або центрифугуванням у градієнті густини, за якого вони випадають в осад [7]. Важливими є такі аспекти: а) при гомогенізації має використовуватись м'яка обробка, що забезпечує достатньо високий вихід незруйнованих ядер; б) відокремлення ядер від інших органел здійснюється центрифугуванням у концентрованому розчині сахарози (~ 2,3 моль/л, питома вага 1,29). Гомогенізація тканини в розчині сахарози (2,3 моль/л) може привести до небажаних теплових ефектів. Оскільки під час виділення важливо підтримувати температуру в інтервалі 0–5 °С, гомогенізацію проводять у розведених розчинах сахарози (0,25–0,44 моль/л), що містять достатню кількість буфера й двовалентних катіонів, а потім отримують неочищену ядерну фракцію після центрифугування за 600–1000 г [8]. Цю ядерну фракцію можна далі очистити, ресуспендувати її в концентрованому розчині сахарози (~ 3,0 моль/л) так, щоб її кінцева концентрація дорівнювала 2,3 моль/л (60 % за вагою). Потім за допомогою центрифугування за 60 000 г упродовж 1 год ядра відокремлюють від інших, менш щільних органел.

Чистоту препаратів ядер клітин якісно контролюють за допомогою світлової мікроскопії, використовуючи фазово-контрастну оптику, або шляхом електронної мікроскопії, застосовуючи метод заморожування–сколювання, або за вмістом ДНК. Видимі домішки – це невеликі фібрили колагену та зрідка – пероксисоми. Забруднення гранулами глікогену можна уникнути, якщо тварин протягом 16 – 24 год перед забоем тримати на голодній дієті. Оскільки зовнішня ядерна мембрана переходить в ендоплазматичний ретикулум, у ній виявляються цитоплазматичні домішки.

Відсутність мітохондрій може бути підтверджено аналізом на сукцинатдегідрогеназу. 5'-Нуклеотидаза є доцільним маркером для плазматичних мембран, а кисла фосфатаза – для виявлення домішок лізосом.

Ядерні оболонки не несуть ніяких специфічних маркерів, окрім нуклеозидтрифосфатаз, проте мають спільний маркер з ендоплазматичним ретикулумом – глюкозо-6-фосфатазу. Також в ядерній оболонці виявлено цитохром b_5 і дегідрогеназу відновленого НАДФ. Оскільки ядерні мембрани схожі за маркерами з ендоплазматичною сіткою, необхідно стежити за тим, щоб не переплутати їх з поверхневими мембранами клітин [8].

Розроблено методи виділення ядерних оболонок, які полягають у диференційному центрифугуванні або в центрифугуванні у градієнті густини [90]. Виділенню ядерних оболонок обов'язково передує руйнування ядер; метою цього процесу є розчинення нуклеоплазми та створення умов, в яких оболонка залишалася б максимально цілою. Найпростішим підходом є мікрохірургічне розрізання ядер і промивання тіней вручну. Проте даний підхід у багатьох випадках є непридатним і може застосовуватись тільки для великих ядер. Другий підхід, в якому використовується механічний вплив, – це обробка ультразвуком, в результаті якої оболонка розривається і її фрагменти звільняються від приєднаного до них гетерохроматину, а ультраструктурна цілісність комплексів ядерних пор при цьому не порушується. Обробка розчинами з низькою іонною силою у відсутності двовалентних катіонів викликає помітне набухання внаслідок змін у конденсованому стані хроматину. Необхідність присутності іонів кальцію та магнію для підтримки хроматину в конденсованому стані означає, що хелатуючі агенти розпушують хроматин, залишаючи при цьому ядерну оболонку інтактною.

Для того, щоб відокремити ядерні оболонки від розчиненого хроматину, після руйнування ядер проводять або диференційне центрифугування, або центрифугування у градієнті густини. Основним недоліком методу є те, що сліди домішок (наприклад, колаген або ядерця) можуть повторно осідати разом з ядерною оболонкою (ЯО), яка сама посилено фрагментується під час послідовного осадження та вивільнення хроматину. Для вимірювання плавучої густини проводять додаткове центрифугування зазвичай у градієнті густини сахарози [90].

3.3.2. Виділення мітохондрій

Виділення мітохондрій – це окремий випадок більш загальної проблеми фракціонування клітин. Мітохондрії виділяють з багатьох джерел стандартними методами [92]. Увесь процес виділення мітохондрій можна розділити на чотири етапи: 1) гомогенізація; 2) відокремлення мітохондріальної фракції методом диференційного центрифугування; 3) очищення отриманої фракції шляхом повторного промивання; 4) визначення чистоти та якості отриманого препарату [8].

Функціонально активні мітохондрії можна виділити з клітин тільки за дотримання певних умов. Оскільки ці органели легко пошкоджуються вна-

слідок осмотичного шоку в гіпотонічному розчині, для їх виділення найчастіше використовують сахарозу (0,3–0,6 моль/л), а для забезпечення ізотонічності середовища виділення до нього вводять трис і хелатуючу речовину ЕДТА [33]. Для отримання високоякісних препаратів мітохондрій важливою є відповідна обробка тканини з метою отримання гомогенату. Рекомендовано проводити її за короткий проміжок часу, а також при охолодженні (0–4 °С), щоб уникнути теплової денатурації білків.

Широко використовуються методи виділення мітохондрій, які базуються на диференційному центрифугуванні з подальшим фракціонуванням у градієнті густини сахарози. Як правило, спочатку з гомогенату видаляють ядерну фракцію за допомогою центрифугування за 600–1600 g упродовж 10–20 хв, а потім з надосадової рідини виділяють фракцію мітохондрій шляхом центрифугування за 4 000–12 000 g упродовж 5–20 хв [8].

Осад мітохондрій зазвичай має коричневий колір, проте забарвлення може розподілятися нерівномірно, що є результатом присутності у їхній фракції частинок різних розмірів, а також домішок немітохондріального походження. Так, перший мітохондріальний осад може містити еритроцити, а також мікросоми (якщо вихідна тканина містила великі кількості ендоплазматичного ретикулума). Їх можна видалити шляхом двотриразового промивання осаду мітохондрій.

Субфракціонування мітохондрій для отримання внутрішніх і зовнішніх мембран та компонентів матриксу проводять після заморожування–відтаювання препарату або обробки ультразвуком. При обробці ультразвуком осаду мітохондрій, суспендованих у середовищі, що містить сахарозу (1,2 моль/л) і АТФ (2 ммоль/л), відбувається руйнування мітохондрій, а після центрифугування у ступеневому градієнті густини сахарози зовнішні мембрани концентруються у смузі сахарози (0,45–1,12 моль/л), а проміжна везикулярна фракція – між двома попередніми – у смузі 1,12–1,20 моль/л. Описано також метод отримання мітохондріальних мембран з печінки шурів [33].

Маркерами внутрішніх мембран мітохондрій є ферменти – переносники електронів (сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза та ін.). Зовнішня мітохондріальна мембрана, яка при фрагментації утворює везикули, містить моноамінооксидазу. Чистоту мембранної фракції можна також визначити методом фазовоконтрастної мікроскопії, за допомогою якої встановлюють забруднення препарату ядрами, цілими клітинами та їхніми фрагментами, а також методом електронної мікроскопії (дає уявлення про присутність в отриманому препараті дрібних клітинних фрагментів, таких як ендоплазматичний ретикулум, пероксисоми та ін.). До можливих домішок, які забруднюють мітохондріальну мембрану, належать ядра, мікросоми, плазматичні мембрани, лізосоми та схожі з ними організми, субмітохондріальні частинки й бактерії [8]. Маркерні ферменти, що відповідають цим органелам, наведено в табл. 9.

**Таблиця 9. Маркерні ферменти органел,
що можуть забруднити мітохондріальну мембрану [8]**

Органели	Маркерні ферменти
Ядра	НАД-пірофосфорилаза
Мікосоми	Глюкозо-6-фосфатаза, НАДФ-Н-дегідрогеназа
Плазматичні мембрани	5'-нуклеотидаза
Лізосоми	β -Глюкуронідаза, кисла фосфатаза
Пероксисоми	Каталаза

3.3.3. Виділення лізосом

Усі методи виділення лізосом спрямовані на мінімізацію забруднення мітохондріями та пероксисомами. Вони можуть бути виділені у градієнті густини сахарози шляхом зміни густини органел, а також за допомогою електрофорезу. Для більш ефективного розділення використовуються комплекси залізо–сорбітол–лимонна кислота та колоїдного золота, які вводять в організм внутрішньом'язовою ін'єкцією. Такі реагенти накопичуються в лізосомах і збільшують їхню плавучу густину [69].

Найпоширенішими є засоби очищення лізосом з використанням речовин для отримання ізоосмотичних градієнтів, наприклад, метризаміду й найкодензу [7]. Після виділення питома активність лізосомальних ферментів-маркерів збільшується у 60–80 разів відносно гомогенату. Активність лізосомальних ферментів повністю виявляється тільки після руйнування мембран (зазвичай при суспендуванні їх у 0,1 % розчині тритону X-100).

3.3.4. Виділення ендоплазматичного ретикулула

Найчастіше мікосоми виділяють з тканини печінки, оскільки ця тканина є достатньо гомогенною та доступною. Для отримання максимального виходу мікосом проводять гомогенізацію в сахарозі (0,25 моль/л) із застосуванням гомогенізатора Поттера–Ельвейма з великою швидкістю (швидкість обертання товкача 1300 об/хв) та упродовж тривалого часу. При доборі іонів для приготування середовища гомогенізації слід урахувати, що мікосоми мають здатність легко агрегувати, що може викликати порушення їхніх функцій. Поверхня мікосом несе високий негативний заряд, який зумовлює посилену сорбцію білків цитоплазми й може перешкоджати агрегації мікосомальних пухирців у відсутності іонів. При нейтралізації поверхневого негативного заряду катіонами відбувається вивільнення сорбованого білка, проте при цьому суттєво зростає здатність пухирців до агрегації [8]. Тому концентрація сахарози має бути не нижче 0,25 моль/л; якщо цієї умови важко дотриматись, то для запобі-

гання агрегації можна застосовувати колоїди (наприклад, альбумін, спермін або спермідин).

Незруйновані клітини та великі частинки видаляють з гомогенату за допомогою диференційного центрифугування за 10 000 г упродовж 10 хв (10 % гомогенат) або 20 хв (20 % гомогенат). На цій стадії гомогенат звільняється від незруйнованих клітин, ядер, мітохондрій, лізосом і пероксисом, а також від великих фрагментів плазматичної мембрани та апарату Гольджі, проте при цьому осаджується й значна частина фрагментів ЕР.

Для виділення загальної мікросомальної фракції з надосадової рідини, отриманої в результаті центрифугування за 10 000 г, суспензію мікросом центрифугують упродовж 1 год за 105 000 г в сахарозі (0,25 моль/л) в кутовому роторі [8]. При цьому на поверхні осаду утворюється пухкий шар, який, за даними електронної мікроскопії, складається з дрібних пухирців гладенького ЕР та вільних рибосом. Інший метод виділення мікросом полягає в тому, що отриману в результаті центрифугування за 10 000 г надосадову рідину не піддають подальшому центрифугуванню, а пропускають крізь колонку, заповнену сефарозою 2В. Такий метод може бути корисним, коли ультрацентрифугування неможливе або утворення осаду загальної мікросомальної фракції є небажаним.

Для видалення розчинних білків, які присутні в осаді мікросом, отриману фракцію промивають сольовим розчином, що містить одновалентні катіони (наприклад, KCl у концентрації 0,15 моль/л) [8]. Перед промиванням осаду з нього необхідно видалити сахарозу. Крім видалення периферичних білків, багаторазове промивання загального мікросомального осаду сприяє відокремленню рибосом. Для видалення з мікросомальних пухирців секреторних білків (нуклеозидтрифосфатази, глікопротеїдів, ліпопротеїдів) і ліпідів використовують різні підходи, зокрема, обробку ультразвуком, гомогенізацію та дією тиску (механічних сил) у пресі Френча. В останньому разі відбувається тимчасовий розрив мікросомальної мембрани й вивільнення вмісту пухирців, після чого вони знову зачиняються.

Отриману мікросомальну фракцію може бути забруднено фрагментами зовнішньої мембрани мітохондрій (ступінь забруднення визначають за активністю моноамінооксидази), лізосомами й пероксисомами. Так, на долю мікросом припадає близько 11 % загальної фосфатазної активності (лізосомальна гідролаза) гомогенату печінки; 9 % загальної каталазної активності. Точно не встановлено, чи є ЕПР забрудненим фрагментами плазматичної мембрани: активність її маркерного ферменту 5'-нуклеотидази виявляється і в ЕПР [49]. Крім цього, 50 % фрагментів апарату Гольджі, присутніх у вихідному гомогенаті, містяться в загальній мікросомальній фракції. Встановлено, що 7–8 % білка потрапляє в загальну мікросомальну фракцію з плазматичної мембрани, 6 – з інтактних мітохондрій, 4–5 – з апарату Гольджі, 3 – із зовнішніх мембран мітохондрій, 1 – з лізосом, 1 % – з пероксисом, а решта – з ЕПР [8].

На сьогодні існують методи відокремлення фракцій гладеньких і шорстких мікосом, які полягають у центрифугування у градієнті густини (метод Ротшильда та ін.) [82].

Розроблено також інший підхід отримання мікосомальної фракції з печінки щурів без використання ультрацентрифугування, який полягає у ліофілізації постмітохондріальної фракції (супернатант, отриманий центрифугуванням за 9 000 g), розчиненні в розчині хлориду калію та осадженні мікосомальної фракції шляхом низькошвидкісного центрифугування за 20 000 g упродовж 20 хв [91]. Мікосоми можна також отримати з міометрію людини.

3.3.5. Виділення апарату Гольджі

Існують різні методи отримання мембран апарату Гольджі з печінки щурів, в яких мембрани з пост'ядерного супернатанту очищують у градієнті сахарози, де вони концентруються за низької густини. Методом субфракціонування апарату Гольджі на градієнті густини перколу було отримано дві його фракції: "легка", збагачена секреторними краплинами, і "важка", що містить елементи типу цистерн (компоненти, розташовані на *цис*-боці апарату Гольджі).

Аналогічно до використання градієнта густини перколу може бути виділено дві мембранні фракції, які містять схожі кількості галактозил- та сіалілтрансферази, а 1,2-манозидаза та β -N-ацетилглюкозамінфосфотрансфераза розташовані нерівномірно [7]. Імунохімічні дослідження показали, що галактозил- та сіалілтрансфераза локалізовані в основному на *транс*-боці апарату Гольджі. На *цис*-боці маркери поки що не знайдено.

Існують також методики отримання ендосом мембран апарату Гольджі, які базуються на центрифугуванні у градієнті густини сахарози [7].

3.3.6. Виділення плазматичних мембран

Плазматична мембрана клітини є важливою фізичною межею, яка відокремлює внутрішній вміст клітини від зовнішнього середовища. Таке розташування плазматичної мембрани визначає її важливу роль у здійсненні багатьох різноманітних клітинних функцій. Це зумовлює важливість вивчення структури та функцій клітинних мембран і відповідних їм біохімічних процесів, а також розробку нових методів отримання мембран, оцінки чистоти збагачених клітинними мембранами фракцій, виділених з будь-яких тканин і клітин.

Методи отримання плазматичних мембран є дуже різноманітними, і ці структури було виділено з різних джерел: кори головного мозку щурів, жовтого тіла бика, яйцеклітин морського їжака, ембріональних клітин миші, еритроцитів людини, фібробластів миші, клітин міокарду щура,

клітин HeLa, кишечника, легень та нирок щура, лімфоцитів миші та теляти, нейтрофілів людини та собаки, плаценти людини, скелетних м'язів кроля, шлунка свині, сперми миші, пухлинних клітин та ін. [7; 63; 88].

Методи виділення плазматичних мембран також базуються на седиментації. Везикулярні фракції плазматичних мембран виділяють з осаду, отриманого центрифугуванням за високих швидкостей, причому такий осад зазвичай є насиченим деякими основними видами внутрішньоклітинних органел. Ступінь насичення залежить від умов гомогенізації, швидкості, часу та від складу середовища центрифугування [33].

Схему отримання плазматичних мембран з гладеньких м'язових клітин наведено на рис. 17.

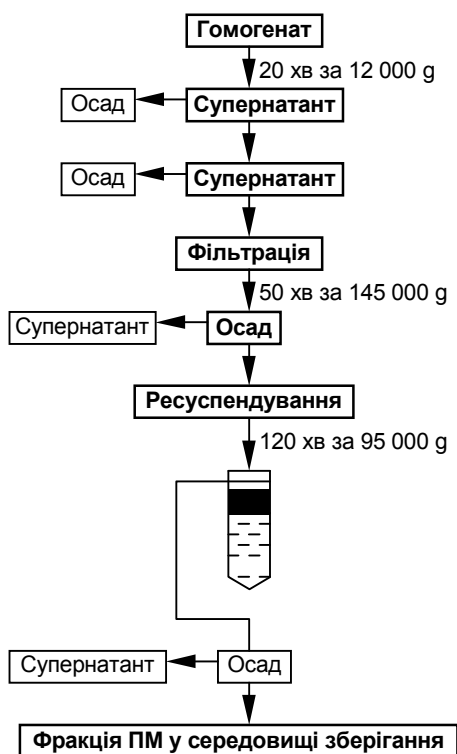


Рис. 17. Схема отримання плазматичних мембран (ПМ) з гладеньких м'язових клітин [33]

Значних успіхів досягнуто при виділенні плазматичних мембран завдяки використанню ізоосмотичних градієнтів перколу, найкодензу та

інших; особливо ефективними ці методики є при виділенні плазматичних мембран з пост'ядерної фракції [7]. Хоч такий метод виділення є більш швидким, можливе забруднення отриманих фракцій мембранами ендосом та апарату Гольджі.

Крім реєстрації активності ферментів-маркерів, для контролю за виділенням плазматичних мембран корисно використовувати радіоактивні мітки, ковалентно приєднані до цілих клітин. Такими мітками слугують реагенти, які зв'язуються з поверхневими клітинними білками або вуглеводами.

При виділенні плазматичних мембран слід дотримуватись певних вимог [7]. Зокрема, умови гомогенізації тканин і клітин слід ретельно підбирати й жорстко контролювати. Під час гомогенізації може відбутися руйнування плазматичної мембрани й утворитися полідисперсна суміш частинок із змінними фізичними та біохімічними властивостями, що значно ускладнює диференційне центрифугування. Слід підібрати такий засіб гомогенізації, який дозволив би отримати великі мембранні фрагменти, які осаджуються за низької швидкості (разом з ядрами). Везикули плазматичної мембрани, що містяться в мікросомальній фракції, очистити значно трудніше.

На сьогодні розроблено швидкі методи виділення плазматичних мембран, що дозволяє уникнути субклітинного фракціонування. Вони засновані на вивільненні в середовище або приєднанні до твердої фази ділянок клітинної поверхні й застосовуються тільки у випадку суспендованих клітин.

Отже, методи виділення й характеристики клітинних органел і мембранних систем тваринних клітин можна розділити на дві групи. До першої належать відносно прості та швидкі методи, які базуються на отриманні мембранних фрагментів, вільних або зв'язаних із зарядженими, вкритими лігандами або антитілами гранулами та на швидкому фракціонуванні гомогенатів у градієнті густини в ізоосмотичних умовах в одно- або двофазній системі.

Проте висока швидкість виділення може бути пов'язаною з погіршенням ступеня очищення фракцій. До другої групи відносять методи, розроблені в першу чергу для подальшого розділення (субфракціонування) первинних фракцій (наприклад, електрофорез у вільному потоці). Хоч ці методи потребують додаткової роботи з мембранами, вони є особливо цінними для отримання ендосом, облямованих везикул і фракцій апарату Гольджі.

Із залученням різних методів фракціонування було визначено біохімічні характеристики клітинних органел (табл. 10) [8].

Таблиця 10. Фізичні та біохімічні характеристики клітинних органел [8]

Органели	Відсоток білка гомогенату печінки	Розмір частинок, мкм	Відцентрове поле	Густина в сахарозі, г/см ³	Біохімічні маркери
Плазматичні мембрани Великі фрагменти Пухирці	0,4–2,5 0,4–2,5	3–20 0,05–3	1500 g, 15 хв 145 000 g, 40 хв.	1,19–1,15 1,19–1,07	5'-нуклеотидаза, Na ⁺ ,K ⁺ -АТФаза, Mg ²⁺ -залежна АТФаза, аденілатциклаза, лужна фосфатаза, лужна фосфодіестераза, рецептори поліпептидних гормонів
Ядра	13	3–12	600 g, 15 хв	>1,30	ДНК
Ядерні мембрани	–	3–12	1500 g, 15 хв	1,22–1,18	Ліпоаміддегідрогеназа
Апарат Гольджі Великі фрагменти Пухирці	1,0 1,0	1 0,05–0,5	2 000 g, 20 хв 145 000 g, 15 хв	1,16–1,12 1,16–1,12	УДФ-галактозилтрансфераза УДФ-галактозилтрансфераза
Мітохондрії	16	0,5–2,0	10 000 g, 25 хв.	1,21–1,17	Моноамінооксидаза, цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа
Зовнішні мембрани мітохондрій	–	–	145 000 g, 40 хв.	1,14	Моноамінооксидаза
Лізосоми	2,0	0,5–0,8	10 000 g, 25 хв	1,216–1,19	Кисла фосфатаза, кислі гідролази
Пероксисоми	3,0	0,5–0,8	10 000 g, 25 хв	1,23–1,18	Каталаза
Ендоплазматичний ретикулум Шорсткий Гладенький	24	0,05–0,3	145 000 g, 40 хв	1,26–1,18 1,23–1,06	Глюкозо-6-фосфатаза Дегідрогенази відновлених НАД і НАДФ, цитохром b ₅ , естераза
Вільні рибосоми й полірибосоми	–	0,025–0,6	145 000 g, 40 хв	>1,26	–
Ендоцитозні пухирці	–	0,1–0,5	145 000 g, 40 хв	–	–
Секреторні вакуолі	–	0,1–0,5	145 000 g, 40 хв	–	–
Краплини жиру	–	0,5–5	–	–	–
Глікоген	–	–	145 000 g, 40 хв	1,6	–

4. МОДЕЛЬНІ МЕМБРАННІ СИСТЕМИ

Для вивчення властивостей структури та функцій біологічних мембран, їхніх індивідуальних ліпідів, ліпідних сумішей і реконструйованих ліпідно-білкових систем було створено численні модельні мембранні системи. Такі системи дозволяють моделювати різноманітні процеси, які відбуваються в мембранах. Вони мають просту структуру, високу стійкість до дії різних чинників, що дозволяє вивчати функціонування модельних мембранних систем за різних умов експерименту. Модельні мембранні системи можна розділити на три типи: 1) моношари; 2) плоскі бішари; 3) ліпосоми й везикули. Кожна із цих систем і багато їхніх різновидів мають свої переваги й недоліки, проте одержана за їх допомоги інформація виявилася дуже цінною при розробці концепцій, пов'язаних з вивченням біологічних мембран. Такі ліпідні мембранні структури мають бути аналогами природних біологічних мембран.

Для створення моделі біологічної мембрани потрібні такі умови: 1) білки та ліпіди мають так розміщуватись у мембрані, щоб максимально можлива кількість полярних груп контактувала з водою та іншими полярними групами; 2) неполярні вуглеводневі ланцюги ліпідів та бічні радикали амінокислот і білків повинні розміщуватися так, щоб максимально унеможливити їх контакт з водою [33].

Моделі рідинних мембран. Найпростішою моделлю біологічної мембрани є межа розділу двох рідин, що не змішуються: вода – масло – вода. На цьому принципі базується будова рідинних мембран, які являють собою шар розчинника, що не змішується з водою й розділяє водні розчини [33]. Використовуються також гептанові мембрани, в яких полярний розчинник розмішений між двома розчинами електроліту й відбиває основні властивості гідрофобного компонента біомембран. Проте такі гептанові мембрани не є селективними щодо катіонів, на відміну від природних біологічних мембран. Тому для моделювання процесів іонного транспорту в гептановий шар вводять різні сполуки, які надають мембрані катіонної селективності. Завдяки цьому стає можливим вивчення електричних характеристик таких систем залежно від складу електроліту. Таким чином було вивчено трансмембранне перенесення іонів за допомогою мембраноактивних комплексонів – антибіотиків валіноміцину та нігерицину.

Серед ліпідних моделей біологічних мембран набули широкого застосування три типи: 1) моношари ліпідної природи на межі розділу фаз розчин електроліту – повітря; 2) плоскі бішарові ліпідні мембрани; 3) ліпосоми, замкнені везикулярні утворення, які складаються з одного або кількох концентричних бішарів [33].

4.1. МОНОШАРИ НА МЕЖІ РОЗДІЛУ ФАЗ ПОВІТРЯ – ВОДА

Багато молекул із чітко вираженими неполярними властивостями адсорбуються на межі розділу фаз повітря – вода, утворюючи шар товщиною всього в одну молекулу. Найлегше за все отримати моношар, для цього достатньо нанести на водну поверхню краплину органічного розчинника з ліпідом і дати час розчиннику випаритися. Такий шар можна досліджувати або безпосередньо на межі розділу, або після його перенесення на якусь основу. Фосфоліпіди й інші амфифільні молекули утворюють орієнтовані моношари, в яких полярні групи контактують з водною фазою, а вуглеводневі ланцюги спрямовані в повітря (рис. 18). Молекули фосфоліпідів вільно рухатимуться по поверхні води в тому разі, коли їх недостатньо для заповнення всієї поверхні, в результаті чого утворюється двовимірний газ.

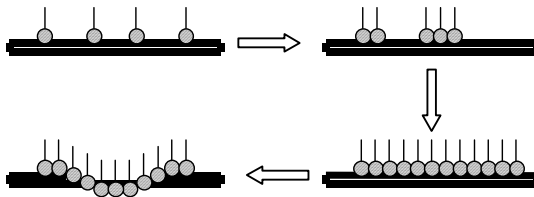


Рис. 18. Механізм утворення моношарової плівки з молекул фосфоліпідів

Коли площа розділу фаз зменшується за допомогою рухомого обмежувача, молекули спочатку спресовуються, а подальше зменшення площини приводить до руйнування моношару, прошарки молекул наповзають один на одного, і стан моношару стає невпорядкованим.

Фосфоліпіди утворюють нерозчинні моношари, оскільки концентрація ліпиду у водній фазі є дуже малою. Такі моношари традиційно вивчають за допомогою плівкових ваг Легмюра (кювети Легмюра) (рис. 19).

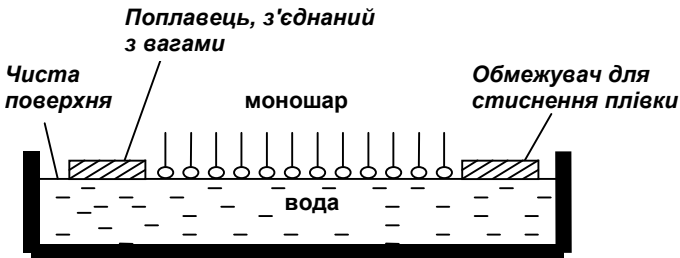


Рис. 19. Схематичне зображення моношару, що утворюється у ванні Легмюра [67]

(Полярні голівки занурені у воду, а неполярні ланцюги звернені в повітря.)

З одного боку кювети існує рухливий поплавець, що дозволяє вимірювати площу поверхні, на якій можуть утворюватися моношари.

Для формування нерозчинного моношару певна кількість ліпиду (зазвичай у леткому розчиннику) наносять на водну поверхню. Ваги Легюра дозволяють точно виміряти площу поверхні (A) і поверхневий тиск (π) моношару. Важливою перевагою методу є можливість змінювати ці параметри, тому він виявився особливо корисним для вивчення "поверхнево-активних" ліпідів, а також таких ферментів, як ліпази [18], які функціонують на межі розподілу ліпід – вода. У моношар можна включати білки, проте в більшості випадків ця система є мало придатною для вивчення поведінки інтегральних мембранних білків. Для характеристики моношарів використовують діаграми "тиск – площа".

Моношар характеризують такі показники: площа, поверхневий натяг, граничний стрибок потенціалу [33]. Вивчення цих величин дає змогу отримати інформацію про адсорбційні взаємодії, фазові переходи радикалів жирних кислот, геометрію та упаковку ліпідних молекул тощо. Крім цього, моношари є придатними для вивчення кінетики й механізму ферментативного каталізу.

4.2. МОНОШАРИ НА ТВЕРДІЙ ОСНОВІ

Моношари, які утворилися на межі розподілу повітря – вода, можна перенести на тверду основу, наприклад, на алкільоване предметне скло. Для цього досить просто доторкнутися цим склом до моношару. За рахунок алкілювання поверхня скла стає гідрофобною. Полярні голівки ліпиду після перенесення моношару на таке скло, як і раніше, контактують з водою. У такий спосіб можна досліджувати моношари, перенесені на тверду основу за різних значень поверхневого тиску π . Було показано, що динамічні властивості й термодинамічні характеристики моношарів на основі, як і моношарів на межі розділу фаз повітря – вода, близькі до таких для бішарів. Розроблено також флуоресцентні методи вивчення орієнтації молекул у моношарі, які розміщуються на основі.

4.3. ПЛОСКІ БІШАРОВІ МЕМБРАНИ

4.3.1. Отримання плоских бішарових мембран

Плоскі мембрани зазвичай формують на отворі в гідрофобному матеріалі й розділяють два розчини електроліту, склад яких можна цілеспрямовано змінювати (рис. 20, 21). Це здійснюється шляхом внесення акварельним пензликом концентрованого розчину фосфоліпиду в розчинник (наприклад, декан), на перетинку з гідрофобного матеріалу (наприклад, з полістиролу або тефлону), в якій існує невеликий отвір (діаметром ~1 мм). Перетинка розділяє дві камери, які містять водні буферні розчини.

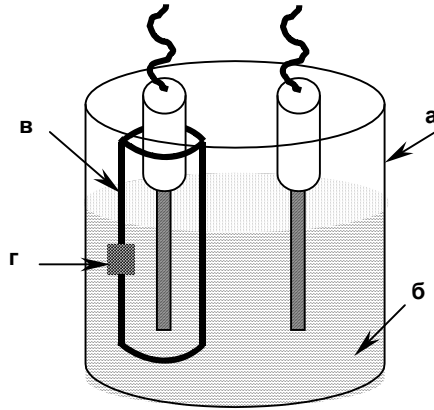


Рис. 20. Технологія приготування бімолекулярних ліпідних мембран із фосфоліпідів:

а – скляна посудина; б – розчин електроліту; в – тефлонова ємність; г – отвір

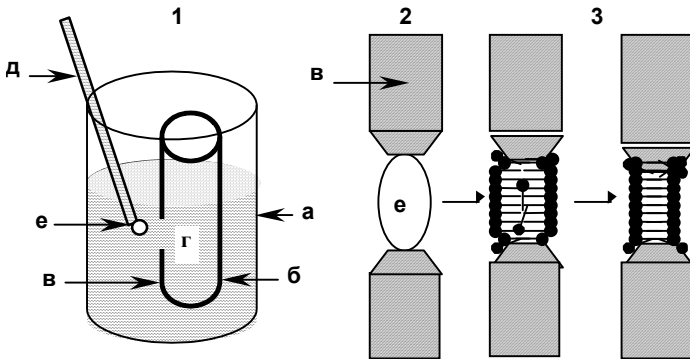


Рис. 21. Механізм утворення бімолекулярних ліпідних мембран:

а – скляна посудина; б – розчин електроліту; в – тефлонова ємність;
 г – отвір; д – капіляр; е – краплина фосфоліпідів;
 етапи досліду: 1 – на отвір у стінці тефлонової ємності наносять краплину розчину фосфоліпідів за допомогою капіляру; 2 – краплина заповнює просвіт отвору; 3 – краплина стоншується з утворенням БЛМ

Більша частина розчинника переходить у воду, а ліпіди за відповідних умов мимовільно (під дією власної ваги та поверхневих сил) утворюють бішарову плівку, яка зтягує цей невеликий отвір і сама стоншується до товщини бішару. Цей процес є багатадійним, певним чином він модулює самозбирання мембрани; його можна спостерігати під світловим мікроскопом.

Такі мембрани часто називають *бімолекулярними ліпідними мембранами (БЛМ)*, а оскільки вони не відбивають світло, їх називають *чорними ліпідними мембранами* [18]. Коли товщина плівки наближається до довжини хвилі видимого світла, мембрана розцвічується всіма квітами веселки як плівка олії на воді. Кольорові смуги повільно плывуть по поверхні плівки, з'являються й зникають, переходять одна в одну, і нарешті на плівці виникає чорна пляма. Вона розширюється й поступово захоплює майже всю поверхню, і плівка стає чорною, що свідчить про певну товщину виниклої структури. Такий шар уже не відбиває світла й здається чорним, отже, спостерігається так зване *первинне почорніння* мембрани, коли її товщина значно перевищує довжину хвилі видимого світла [43].

Потім мембрана потоншується, і виникає інтерференційна картина, оскільки її товщина стає порівнянною з довжиною хвилі видимого світла. Кінцевою стадією процесу утворення ліпідного бішару є *вторинне почорніння*, воно спостерігається в результаті потоншення мембрани до 5–6 нм [33].

Стоншення плівки зумовлено виштовхуванням води із щільного внутрішнього шару мембрани в електроліт і переміщенням фосфоліпідних молекул до країв отвору. У результаті цих процесів на отворі в гідрофобному матеріалі формується подвійний фосфоліпідний шар, причому полярні групи моношарів орієнтовані в розчин, який оточує мембрану, а неполярні орієнтовані всередину структури. Мембрана стабілізується електростатичними взаємодіями між іонами електроліту й зарядженими групами фосфоліпідів, а також вандерваальсовими силами, які діють між гідрофобними ділянками фосфоліпідних молекул. За допомогою електродів, уведених у розчини електроліту й підключених до вимірювального приладу, можна зареєструвати опір бішару, його ємність і трансмембранну різницю потенціалів. Основні властивості біологічної мембрани та бішару, отриманого, наприклад, із фосфатидилхоліну яєчного жовтка в тетрадекані, виявилися дуже близькими [33].

Такі мембрани, ймовірно, являють собою найбільш адекватну модель біологічних мембран. Базуючись на їхній будові, можна провести реконструкцію різних функціональних мембранних комплексів, оскільки біологічні мембрани містять у своєму складі ліпідний бішар, причому самозбирання мембран починається саме з його утворення, а потім вже відбувається вбудовування в ліпід білкових, полісахаридних та інших компонентів, що приводить до формування мембранної системи.

У перших дослідженнях із створення штучних фосфоліпідних бішарових мембран застосовували загальну фракцію фосфоліпідів мозку бика. У подальшому використовували фракції ліпідів рослин, різних субклітинних структур – мітохондрій, хлоропластів, плазматичних мембран, а також мікроорганізмів й окремих груп клітин, наприклад, "тіней" еритроцитів, а крім того, гомогенні препарати фосфоліпідів: фосфатидилхолін, фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламін, холестерин і

синтетичні ліпіди [33]. Розчинниками зазвичай виступають *n*-алкани, особливо гептан і декан.

Плоскі мембрани, отримані в такий спосіб, можна використовувати для вивчення мембранних білків (наприклад, іонних каналів), але їхній недолік полягає в тому, що вони містять слідові кількості розчинника. Крім того, вони дуже нестабільні, особливо у присутності невеликих кількостей детергентів та інших домішок. Щоб усунути проблеми, пов'язані з наявністю слідів розчинника, й полегшити включення в мембрани інтегральних мембранних білків, було розроблено іншу методику приготування плоских мембран. Більш адекватною моделлю біологічної мембрани є бішари, отримані за методом М. Монтала та П. Мюллера, в яких мембрана формується шляхом з'єднання двох моношарів фосфоліпиду, утворених на межі розділу фаз електроліт – повітря. Такі штучні системи набули назви *мюллерівських мембран*. У цьому випадку плоска мембрана формується з моношару на межі розділу фаз або на кінчику невеликої піпетки при її простому зануренні в розчин, або на невеликому отворі в перетинці з гідрофобного матеріалу.

Також у модельних дослідженнях при видуванні розчину фосфоліпідів з трубки з гідрофільного матеріалу, зануреної в розчин електроліту, було сформовано *сферичні бішари*. Радіус кривизни таких мембран є значним (1 см), кривизною їхньої поверхні можна знехтувати, і такі мембрани вважаються еквівалентними плоским [33]. При цьому вони мають площину, набагато більшу за таку мюллерівських, що є особливо важливим при дослідженні трансмембранного перенесення речовин.

Моношари, з'єднані своїми гідрофобними зонами після випаровування розчинника з межами розділу фаз, можуть бути сформованими з двох різних фосфоліпідів, що дозволяє отримати асиметричні бішари, які називають *монталовськими*. Моношари, які містять очищені мембранні білки, можна одержати на поверхні везикулярних білково-фосфоліпідних дисперсій і використовувати їх для формування плоских мембран. Крім того, можна провести злиття мембранних везикул, що містять іонні канали, з попередньо сформованою плоскою мембраною і таким шляхом включити в неї досліджуваний білок.

Тип мембрани, яка використовується, залежить від завдань дослідження. Сферичні бішари є найбільш зручними для вивчення процесів перенесення речовин і злиття мембран.

4.3.2. Електричні властивості ліпідних бішарів

Важливою перевагою плоских мембран є можливість проведення на них електричних вимірювань. Ця система особливо корисна для вивчення пор або каналів переносників, що полегшують або прискорюють перенесення заряду через бішар з одного водного компартменту в іншій. У водні камери неважко помістити електроди, розчини в них можна легко

заміняти, а вимірювання струму й/або напруги є дуже точними й відрізняються високою чутливістю. Інша методика полягає у формуванні мембран на кінчику мікропіпетки (діаметром менше 1 мкм). Невеликий фрагмент бішару на такій "петч-піпетці" можна використовувати для проведення дуже чутливих електричних вимірювань з реконструйованими очищеними мембранними білками (наприклад, з ацетилхоліновим рецептором) і досліджувати різні процеси на молекулярному рівні.

Бімолекулярні ліпідні мембрани (БЛМ), плоскі чи замкнені у сферичні везикули (ліпосоми), відіграють значну роль у мембранології. Звичайно, вони не можуть відтворювати складні функції клітинної мембрани, оскільки в них немає потрібних для цього білків, але за їх допомогою можна виконати найпростіші завдання, наприклад, розподіл двох розчинів. Перевірити здатність БЛМ служити бар'єром можна, вимірюючи електричний опір БЛМ [43]. Виявилось, що електричний опір БЛМ є дуже великим – приблизно 10^7 – 10^8 Ом/см². Слід зазначити, що шар розчину електроліту такої самої товщини (наприклад, KCl у концентрації 0,01 моль/л) мав би опір усього 10^{-4} Ом/см², тобто в 10^{12} разів більше. Отже, бішарова ліпідна мембрана – дуже гарний ізолятор, вона ідеально відокремлює розчини один від іншого, не даючи їм змішуватися. Чому саме найтонша ліпідна плівка товщиною 50 Å так успішно протистоїть електричному струму? Причину знов-таки слід шукати в амфіфільності ліпідних молекул. Сховавши усередину мембрани свої хвости, вони створюють усередині бішару гідрофобну серцевину. Це означає, що в такому шарі дуже низка діелектрична проникність – приблизно 2, тоді як у воді – 80, тому в таку мембрану не надходять заряджені частинки [1]. Коли два середовища розташовані поряд, одне з низькою діелектричною проникністю (ліпід), а інше – з високої (вода), то присутні в системі іони, безсумнівно, віддають перевагу воді, причому ця перевага є дуже явною. Концентрація іонів у водній фазі більша в 10^{12} разів, ніж у ліпідній. Інакше кажучи, якщо концентрація іонів в одному розчині дорівнює 0,1 моль/л, то в ліпідній фазі вона має знизитися до 10^{-13} моль/л. Зрозуміло, що за такої незначної концентрації заряджених частинок провідність мембрани має бути надзвичайно низькою, що й спостерігається в досліді.

Повертаючись до модельного ліпідного бішару, слід зазначити, що він є ідеальною матрицею, на якій можна послідовно реконструювати й вивчити будь-які мембранні системи [43]. Сама по собі БЛМ відкриває величезні можливості для вивчення тих властивостей мембран, які зумовлені насамперед ліпідним матриксом. Наприклад, можна досліджувати електрохімічні властивості межі розподілу БЛМ – розчин електроліту, будову подвійного електричного шару, адсорбцію заряджених частинок, вивчити механічні властивості системи, стійкість бішарів в електричних полях і механізм їх руйнування. Нарешті, система двох БЛМ виявилась особливо продуктивною для вивчення молекулярного механізму злиття мембран.

4.3.3. Іонний транспорт через мембранні бішари

Як уже відзначався вище, БЛМ – це гарний ізолятор, тобто перешкода на шляху іонного транспорту, яка забезпечує бар'єрну функцію. Уже перші експерименти показали, що додавання в середовище з БЛМ жиророзчинних кислот приводить до перенесення через мембрану протонів, які самостійно через неї не проходять.

Процеси транспорту іонів через мембрани було вивчено за допомогою мембраноактивних комплексонів, наприклад, антибіотику валіноміцину. Їх активність базується на здатності зв'язувати катіони в розчині й включенням їх до структури своєї молекули в результаті взаємодії з різними полярними групами. Такі мембраноактивні комплексони становлять природні або штучні сполуки (пептиди, депсипептиди, депсиди та поліетери), які здатні селективно підвищувати проникність мембран різного походження до катіонів. Валіноміцин є циклічним депсипептидом (молекулярна маса 111 кДа) і містить шість карбонільних груп (рис. 22).

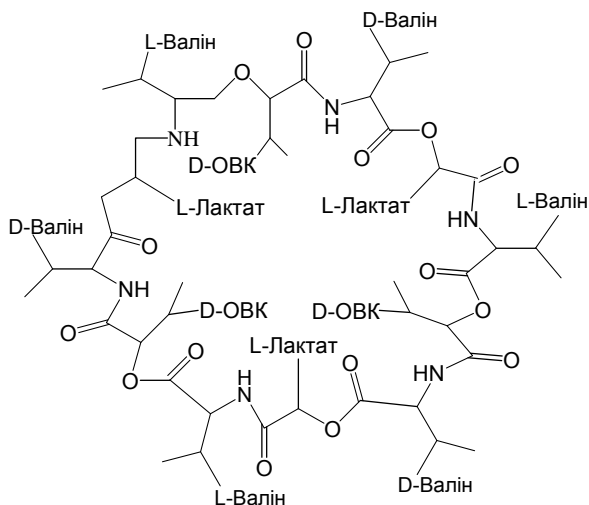


Рис. 22. Структура комплексу молекули валіноміцину з іоном K^+ (L-лактат-L-валін-D-оксизовалеріанова кислота-D-валін) (Іон K^+ фіксується за рахунок іон-дипольної взаємодії за участю карбонільних груп пептиду (позначені кружками).)

Додавання в систему цього антибіотику робить БЛМ проникною для іонів калію – проходить 100 000 іонів K^+ на один іон Na^+ . Молекула валіноміцину утворює комплекси з іонами калію [3], водночас він добре розчиняється в ліпідній фазі, тому що його зовнішня поверхня є гідрофобною, а внутрішня –гідрофільною. Картина перенесення іонів виглядає таким чи-

ном: до лівого боку мембрани, до якого прикладено електричне поле, підходить іон калію й перестрибує на вільну молекулу валіноміцину. Цей заряджений комплекс під дією поля мігрує через мембрану до іншого боку, там іон калію надходить у розчин, а вільна молекула валіноміцину повертається назад. Можна сказати, що в мембрані існує карусель, тобто іони транспортуються за допомогою рухомих переносників [2]. У випадку протонної каруселі роль переносника відіграє аніон жиророзчинної кислоти. Раніше вважали, що системи перенесення калію та натрію в електростимульованих клітинах можуть діяти за типом рухомих переносників; згодом виявилось, що перенесення іонів здійснюється через спеціалізовані канали.

За допомогою БЛМ було вивчено механізми дії багатьох фармакологічних речовин – роз'єднувачів окиснення й фотосинтетичного фосфорилування, іонофорів. Велику зацікавленість дослідників викликає реконструкція на бішарах функціональної активності різних енергозалежних систем біологічних мембран, що відповідають за гормональну рецепцію, транспорт іонів, поліелектролітів, за імунологічні процеси. Так, на бішарах було реконструйовано білково-ліпідні комплекси біомембран (АТФази), а також вивчено механізми злиття мембранних систем.

4.4. ПЛОСКІ БІШАРОВІ МЕМБРАНИ НА ТВЕРДІЙ ОСНОВІ

Фосфоліпідні бішари можна також формувати на твердих гідрофільних основах (наприклад, на окисдованих силіконових пластинках), послідовно переносючи два моношари з межі розділу повітря – вода. Між твердою основою й ліпідними полярними голівками, очевидно, існує водний прошарок. Таким способом можна одержати стабільний бішар з моношару з певною середньою площею на молекулу. Ці бішари зручні для фізико-хімічних досліджень індивідуальних ліпідів, сьогодні вони знайшли застосування й для вивчення мембранних білків. У бішарах дипальмітоїлфосфатидилхоліну, приготовлених у такий спосіб, відбувається чіткий температурних фазовий перехід, як і у випадку ламелярних ліпідних дисперсій. Особливо цінними ці бішари є для вимірювання латеральної дифузії мембранозв'язаних молекул за допомогою флуоресценції. Відповідні результати цілком узгоджуються з даними, отриманими на інших системах.

4.5. ЛІПОСОМИ

Термін *ліпосома* (лат. – ліпідне тіло) стосується будь-яких ліпідних бішарових структур, вміст яких є водним розчином якоїсь речовини [53]. Вони є широко розповсюдженою моделлю біологічних мембран. Ліпосоми являють собою замкнені сферичні пухирці, утворені з різних амфіпатичних речовин, таких як фосфоліпіди. При взаємодії з водними розчи-

нами ці речовини самоорганізуються у двошарові мембрани. У процесі утворення ліпосом у них можна включати різноманітні хімічні сполуки.

Уперше ліпосоми було виявлено в 1964 р. англійським вченим А. Бенгхемом з колегами [54], які спостерігали утворення субмікроскопічних круглих частинок при додаванні води до сухих амфіпатичних речовин, наприклад, до фосфоліпідів.

Термін *мікрокапсули* для визначення ліпосом чи фосфоліпідних везикул (ФЛВ) було запропоновано Дж. Осто в 1970-ті рр. [28]. Пік розвитку цього напрямку припадає на 1980-ті рр., коли було запатентовано основні методи одержання найрізноманітніших фосфоліпідних везикул (ФЛВ) [87]. Деякі ліпідні везикули отримали спеціальні назви, наприклад, *протеоліпосоми*, *імуносоми*, *віросоми*, останні використовують як штучні вакцини. Термін *фармакосоми* стосується фосфоліпідних везикул з ковалентно приєднаними лікарськими речовинами, тобто амфифільних попередників лікарських препаратів [87].

4.5.1. Механізм утворення ліпосом

Формування ліпосом відбувається таким чином. Багато фосфоліпідів при диспергуванні у воді мимовільно утворюють гетерогенну суміш везикулярних структур, що складається з кількох бішарових концентричних оболонок (рис. 23).

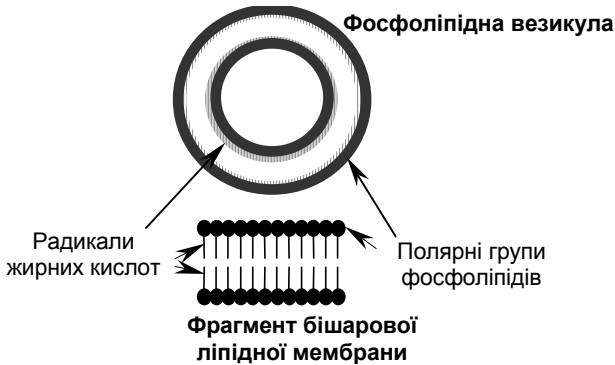


Рис. 23. Самодовільна організація фосфоліпідів у везикули у водному розчині

Як відомо, молекули фосфоліпідів складаються з полярної частини (голівки) і неполярної (хвосту жирних кислот). У водному розчині голівки експонуються назовні (у водний розчин), а хвости ховаються всередину, в результаті чого й утворюються мембранні везикули.

На електронних мікрофотографіях А. Бенгхем побачив багатошарові частинки, дивно схожі на мембранні структури клітини. Подальше дослідження показало, що неорганічні іони, які присутніми в розчині в момент набрякання фосфоліпідів, включаються всередину цих частинок й утримуються там тривалий час, обмінюючись з іонами зовнішнього розчину з дуже малою швидкістю. Так уперше було встановлено, що фосфоліпідні, які є основними компонентами клітинних мембран, здатні мимовільно утворювати у воді замкнені мембранні оболонки. Ці оболонки захоплюють у себе частину навколишнього водного розчину, а утворююча їх фосфоліпідна мембрана має властивості напівпроникного бар'єра, який легко пропускає воду, але перешкоджає дифузії розчинених у ній речовин.

Отже, утворені частинки – це пухирці, які складаються з мембран і містять невелику кількість води. Саме вони й стали моделлю для вивчення фізичної хімії ліпідного бішару й біології клітинних мембран. Їхня структура – водна серцевина, оточена ліпідним бішаром – нагадує живу клітинну мембрану (рис. 24).

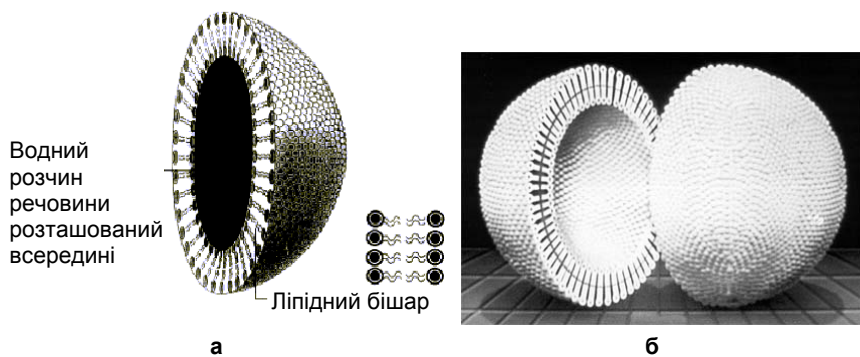


Рис. 24. Моделі структури ліпосоми

Це були перші ліпосоми, які вдалося охарактеризувати, і зараз вони називаються *мультиламелярними везикулами (МЛВ)*. Вони являли собою подвійні моношари, в яких молекули фосфоліпідів орієнтовані неполярними частинами всередину везикули у водний розчин. МЛВ складаються з кількох десятків, а то й сотень ліпідних бішарів, розділених водними проміжками, і мають досить великі розміри (до 50 мкм).

Можна також створити моноламелярні везикули, тобто везикули, сформовані одинарним бішаром [22]. Їх можна підрозділити на *малі моноламелярні везикули (ММВ)* з діаметром від 200 до 500 Å і *великі моноламелярні везикули (ВМВ)* з діаметром від 500 до 5000 Å (рис. 25, 26). Можна також приготувати гігантські фосфоліпідні везикули розміром з клітину, що мають діаметр до 300 мкм.

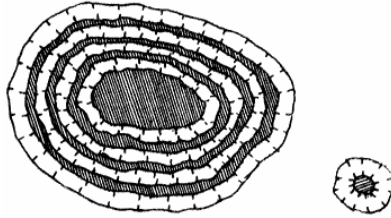


Рис. 25. Мультиламелярні та моноламелярні ліпосоми [22]
 (Ліпосоми можуть бути одношаровими (діаметр 250–300 Å) й багатшаровими (5–50 мікрметрів). Заштриховані тони – місце перебування води, світлі – бімолекулярний ліпідний шар, "хвости" молекул у його складі звернені всередину шару.)

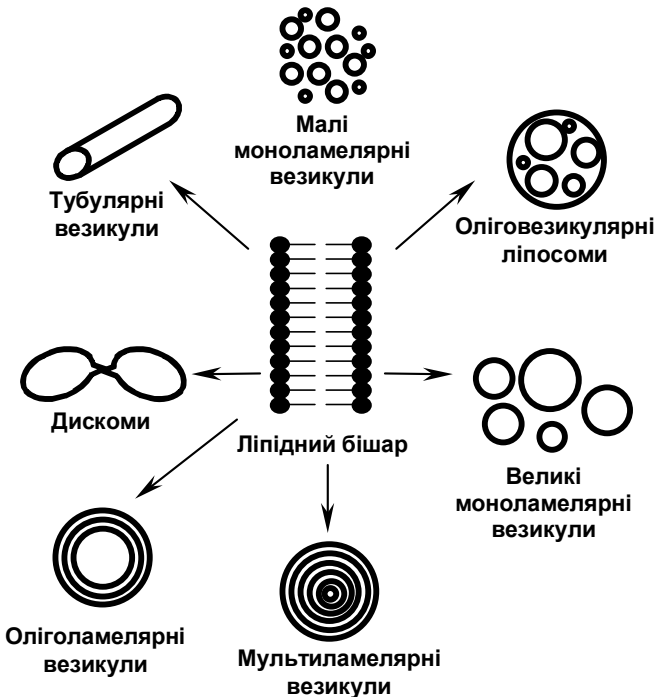


Рис. 26. Різні типи ліпосом [5]
 (Дискоми – дископодібні ліпосоми, тубулярні трубчасті везикули)

Між моно- та мультиламелярними везикулами лежить велике поле різноманітних ліпосомальних структур, що відрізняються за розмірами, формою, кількістю ліпідних бішарів і внутрішньою будовою. Зовні ліпосоми не завжди виглядають як глобулярні частинки, іноді вони мають

сплощену дископодібну форму (так звані диски) чи набувають вигляду дуже довгих і тонких трубок, які називають тубулярними ліпосомами [5].

Ліпосоми використовують насамперед як модельні системи, в які можна вбудовувати різні білки, а також для створення систем доставки включених у них лікарських препаратів. Вони дозволяють вивчати широкий спектр властивостей природних мембран, які пов'язані в першу чергу із складом і станом фосфоліпідного компонента. Слід зазначити, що біологічні мембрани складаються з тих самих фосфоліпідних шарів, хоч і містять численні білкові молекули.

4.5.2. Властивості ліпосом

Важливими характеристиками ліпосом є їхній ліпідний склад, середній діаметр і ступінь гетерогенності за розмірами. Про розподіл ліпосом за розміром можна судити за даними: 1) гельпроникної хроматографії; 2) світлорозсіювання; 3) ультрацентрифугування; 4) електронної мікроскопії. Особливий інтерес для тих, хто досліджує здатність ліпосом містити в собі різні речовини, становлять такі параметри, як: 1) внутрішній водний об'єм, тобто кількість водорозчинної речовини в розрахунку на 1 моль ліпиду; 2) ефективність включення, або частка водного об'єму, включеного всередину везикул. Перший параметр збільшується із зростанням діаметра ліпосом, а другий є прямо пропорційним концентрації ліпиду.

Ліпосоми як штучні мембрани мають цілу низку фізико-хімічних характеристик. Властивості ліпосом та їх поведінка визначаються насамперед наявністю в них замкнутої мембранної оболонки [5]. Деякі властивості ліпосом, такі як рідинні властивості мембрани, розмір, поверхневий заряд залежать від ліпідного складу й технології виготовлення.

Незважаючи на молекулярну товщину (близько 4 нм), ліпідний бішар відрізняється винятковою механічною міцністю та гнучкістю. Фосфоліпиди в бішарі залежно від температури зазнають фазових змін – від стану гелю за низьких температур до рідинно-кристалічного стану за високих. Тобто в рідинно-кристалічному стані бішару його компоненти характеризуються високою молекулярною рухливістю, тому в цілому мембрана поводить себе як досить рідка, плинна фаза. Наприклад, у стані гелю ланцюги жирних кислот щільно упаковані, за підвищення температури вони стають більш рухливими, а бішар – більш тонким. Завдяки такій структурі бішару ліпосоми зберігають цілісність за різних пошкоджуючих впливів, а їхня мембрана має здатність до самоліквідування виникаючих у ній структурних дефектів [5]. Разом з тим, гнучкість бішару і його плинність додають ліпосомам високої пластичності. Так, ліпосоми змінюють розміри та форму у відповідь на зміну осмотичної концентрації зовнішнього водного розчину. За сильного осмотичного стресу цілісність може порушитися, і ліпосоми можуть роздрібнитися на частинки менших розмірів.

У ході утворення ліпосом гідрофільні речовини зазвичай потрапляють у внутрішній водний простір пухирців, а ліпофільні субстанції вбудовуються

у фосфоліпідний шар. За відповідного добору ліпідних компонентів утворюються стабільні пухирці, які тривалий час за температури тіла не ушкоджуються в сироватці, зберігаючи свій фармакологічно активний вміст [18]. Крім того, з'явилася можливість мітити пухирці, забезпечуючи тим самим селективність їх дії на певні типи тканин, наприклад, на тканину пухлини.

Отже, рухливість молекул фосфоліпідів є важливою характеристикою природних мембран. Мембрани ліпосом також являють собою динамічні утворення, молекули фосфоліпідів в їхньому складі здатні до латеральної дифузії (тобто переміщення в межах моношару), до зміни взаємної орієнтації й переходів з одного моношару в інший (фліп-флоп). Другою важливою властивістю біомембран, яку добре модулюють ліпосоми, є проникність для різних сполук. Якщо у природних мембранах проникність може регулюватися присутністю великої кількості вбудованих у мембрану білкових молекул, то на ліпосомальній мембрані можна вивчати проникність ліпідного бішару для різних сполук за різних умов, а також участь у цьому процесі білків та інших компонентів мембран, "умонтованих" у ліпосоми. Проникність ліпосомальної мембрани залежить від її фазового стану, і вона є особливо великою поблизу температури фазового переходу фосфоліпідів ліпосоми, коли молекули в мембрані є максимально не впорядкованими [33].

Для практичного застосування ліпосом і везикул винятково важливою є їхня здатність включати в себе й утримувати речовини різної природи. Це може бути зроблено різними способами (рис. 27). Коло речовин, що можуть бути включеними до ліпосом, є надзвичайно широким – від неорганічних іонів і низькомолекулярних органічних сполук до великих білків і нуклеїнових кислот. Хоч ліпосоми є досить міцними й стабільними в широкому діапазоні умов, їх можна легко зруйнувати до міцелярного стану за допомогою поверхнево-активних речовин, які належать до детергентів. Процес солюбілізації є зворотним, і ліпосоми знову формуються, якщо детергент видалити з міцелярного розчину. Самозбирання мембран шляхом видалення солюбілізуючого детергента застосовують для вбудовування інтегральних мембранних білків у ліпідний бішар (реконструкція), одержуючи при цьому білоквмісні ліпосоми – протеоліпосоми [60].

4.5.3. Методи отримання ліпосом

Розглянемо деякі методи одержання ліпосом та їхні характеристики. Кожен з них дозволяє отримати ліпосоми не тільки різних розмірів і з різною кількістю концентричних бішарів, а й включати до них різноманітні хімічні сполуки та біологічно активні молекули. Ліпосоми отримують як з природних, так і з синтетичних фосфоліпідів. Як правило, у вихідну ліпідну суміш вводять додатково холестерол (іноді до 40 %), що надає мембранам підвищеної міцності.

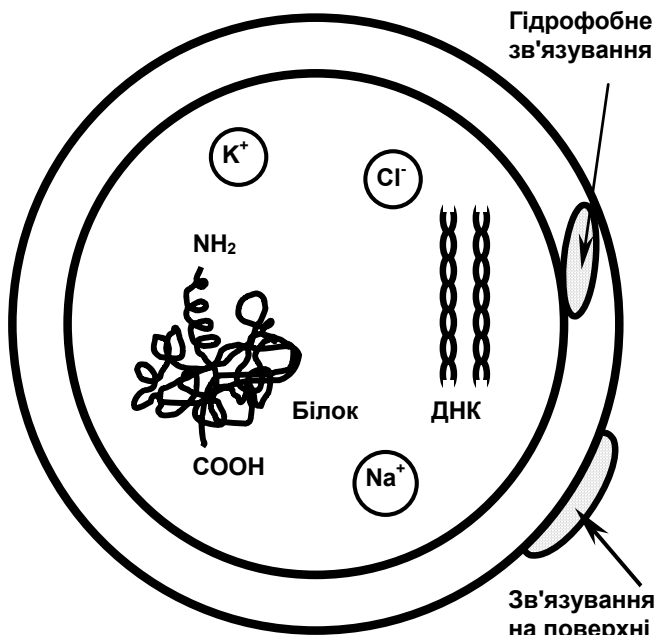


Рис. 27. Способи включення різних речовин у ліпосоми [5]

Водорозчинні речовини входять до внутрішнього водного об'єму ліпосом. Наявність у бішарі достатньо довгої вуглеводневої ділянки дозволяє вводити в нього гідрофобні молекули. На поверхні бішару можна адсорбувати різні хімічні речовини, а також хімічно зв'язувати їх з ліпідами або іншими компонентами мембрани.

Малі моноламелярні везикули (ММВ). Їх готують шляхом ультразвукової обробки водних дисперсій фосфоліпідів. Органічний розчин фосфоліпідів випаровують до отримання тонкої ліпідної плівки, яку потім заливають або водним буферним розчином, або розчином сполуки, яку планують включити до ліпосом (рис. 28) [33]. Можна також нанести сухий фосфоліпід на поверхню водного розчину.

При механічному струшуванні утворюється каламутна суспензія, яка містить великі шматочки ліпиду або багат шарові ліпосоми. При подальшій ультразвуковій обробці відбувається дроблення ліпідних частинок й утворення прозорої рідини, що злегка опалесцює. За даними електронно-мікроскопічного аналізу, вона містить дрібні одношарові ліпосоми розміром у кілька десятків нанометрів.

Після ультразвукової обробки везикули фракціонують за розміром методом гелпроникної хроматографії або центрифугуванням у градієнті гліцеролу [68], для того щоб одержати дуже гомогенну популяцію вези-

кул діаметром $\sim 250 \text{ \AA}$. Інший спосіб приготування таких везикул полягає у швидкому введенні етанольного розчину ліпиду у водну фазу. Для приготування ММВ можна використовувати також прес Френча.

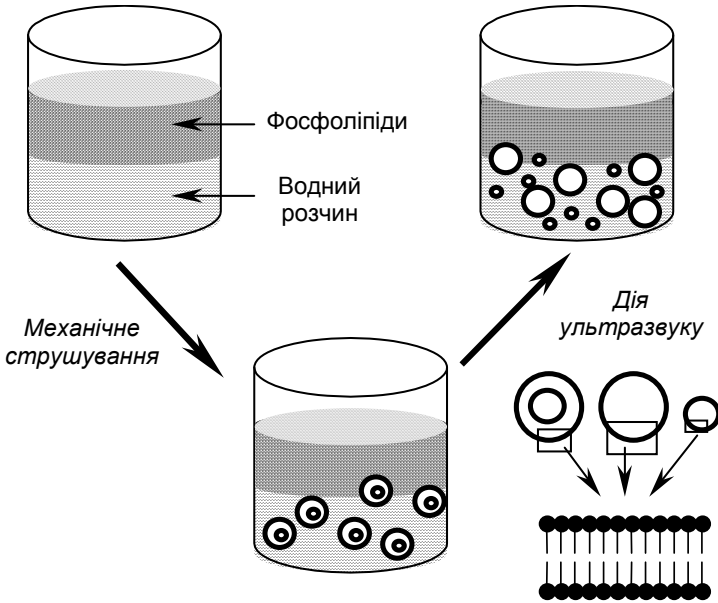


Рис. 28. Метод приготування моноамелярних ліпосом шляхом дії ультразвуку

Перевагою таких везикул є їхня гомогенність, проте малий розмір може бути й недоліком. Принаймні, варто мати на увазі, що за малого радіуса кривизни бішару ММВ утруднюється упакування в ньому ліпідних молекул. Площа поверхні зовнішнього моношару цих везикул майже вдвічі більша площі внутрішнього моношару, тому близько 70 % ліпідів ММВ розміщуються на зовнішній поверхні.

Ліпідні молекули, що мають форму "зворотного конуса", наприклад, фосфатидилхолін чи сфінгомелін, перебуватимуть переважно в зовнішньому моношарі, що зумовлює ліпідну асиметрію бішару. Ці пакувальні ефекти, ймовірно, і визначають асиметричну орієнтацію деяких мембранних білків, вбудованих у везикули (ММВ і ВМВ).

Температурний фазовий перехід ліпідів у ММВ є розширеним, швидше за все, в результаті впливу малого радіуса кривизни на кооперативність переходу. Внутрішній водний об'єм ММВ досить малий – від 0,5 до 1 л/моль. Деякі характеристики ММВ наведено в табл.11 і на рис. 29.

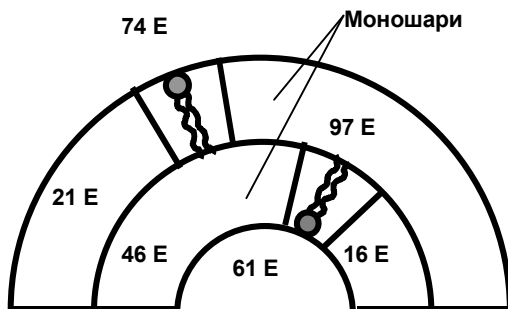


Рис. 29. Поперечний переріз бішару в малих моноамелярних везикулах з позначенням деяких характерних розмірів [72]

Таблиця 11. Параметри ММВ, приготованих з яєчного фосфатидилхоліну [18]

Параметр	Значення
Молекулярна маса (гідродинамічна), Да	$1,88 \cdot 10^6$
Парціальний питомий об'єм, мл/г	0,9848
Радіус зовнішнього моношару, Å	99
Радіус внутрішнього моношару, Å	62
Товщина зовнішнього моношару, Å	21
Товщина внутрішнього моношару, Å	16
Кількість ліпідних молекул: у зовнішньому моношарі	1 658
у внутрішньому моношарі	790
Площа поверхні на полярну голівку, Å ² : – у зовнішньому моношарі	74
– у внутрішньому моношарі	61
Поперечний переріз ацильних ланцюгів, Å ² : – у центрі бішару в зовнішньому моношарі	46
– у внутрішньому моношарі	97
Товщина гідрофобної ділянки бішару, Å	37

Великі моноамелярні везикули (ВМВ). Уперше великі везикули було отримано в 1970-ті рр., і відтоді розроблено численні методи їх приготування. Вибір методу залежить від ліпідного складу везикул та їх передбачуваного призначення. Наприклад, методи, за яких відбувається розведення ліпосомальної дисперсії, виявляються не придатними для інкапсуляції лікарських препаратів, а методи, які базуються на використанні органічних розчинників, не є придатними для реконструкції білків, і найчастіше для одержання ВМВ використовують такі підходи:

1. *Діаліз або розведення детергентних розчинів* [93]. Це найбільш популярний метод, що використовується для біохімічних досліджень, оскільки він придатний для включення білків в утворені ВМВ. Надлишком детергента диспергують ліпід (чи ліпід з білком), а потім детергент вида-

ляють або за допомогою діалізу, або за допомогою гель-фільтрації на сефадексі. По мірі видалення детергента утворюються великі везикули – 1 мкм. Детергенти, які мають високу ККМ, тобто високу рівноважну концентрацію мономера – порядку ммоль/л (наприклад, холат, дезоксихолат, октилглюкозид), майже цілком видаляються діалізом. Детергенти з низькою ККМ (наприклад, тритон X-100) видаляються лише частково, для цього використовують гідрофобні смоли типу біобідс, що вибірково зв'язують детергент. У деяких випадках досить просто розвести суміш, щоб знизити концентрацію детергента до рівня, за якого ліпіди починають мимовільно формувати везикули. Розмір ліпосом залежить не тільки від типу використаного детергента чи ліпіду, але й від швидкості видалення детергента. Зазвичай за допомогою холату одержують БМВ невеликого розміру (діаметром 500–800 Å), а за допомогою октилглюкозиду – популяцію більш великих везикул (1000–2000 Å). Певні проблеми можуть створювати слідові кількості детергента. Внутрішній об'єм БМВ набагато більший, ніж у ММВ, і зазвичай лежить в інтервалі від 5 до 20 л/моль.

2. *Інфузія й обернено-фазове випарювання* – це два різні методи, пов'язані з використанням неполярних розчинників для одержання БМВ. Для приготування модельних мембран, що містять білки, ці методи є мало придатними.

3. *Методи злиття*. Існує кілька підходів, заснованих на злитті ММВ до утворення ліпосом великого розміру. До них належать повторні операції заморожування–відтаювання, що придатні для реконструкції деяких мембранних білків, а також використання Ca^{2+} для злиття ММВ, що містять фосфатидилсерин.

4. *Додавання фосфатидилхолінів з короткими ланцюгами* [66] у кількості до 20 % від загального вмісту ліпідів. При цьому мультиламелярні бішари перетворюються на стабільні БМВ.

5. *Додавання жирних кислот або детергентів* за певних умов викликає злиття ММВ з утворенням БМВ. Додавання жирних кислот сприяє також включенню білків у бішари БМВ.

6. Швидка екструзія мультиламелярної дисперсії через полікарбонатні фільтри дає БМВ діаметром 600–1000 Å. Цей метод має низку істотних переваг.

7. *Короткочасне підвищення рН* приводить до утворення везикул з молекул фосфатидної кислоти, причому суміші, які містять цей фосфоліпід, утворюють як ММВ, так і БМВ.

8. *Моноламелярні везикули клітинних розмірів*. Ці структури утворюються при звичайній гідратації ліпідів і ліпідно-білкових сумішей у розчинах з низькою іонною силою. Розмір везикул становить від 0,1 до 300 мкм, а їхній внутрішній водний об'єм досягає 300 л/моль. Ці везикули залишаються стабільними при центрифугуванні, проведеному для їх поділу за розмірами. Крім того, в них можна вводити мікроелектроди для проведення електричних вимірів.

Мультиламелярні везикули. Як правило, вони не використовуються, оскільки за деякими своїми характеристиками значно поступаються моноламелярним везикулам. Ці везикули є осмотично активними, але складність їх внутрішньої організації ускладнює аналіз результатів вимірювання осмотичної активності.

4.5.4. Використання ліпосом

З моменту відкриття везикул і встановлення їхньої інкорпоруючої та стабілізуючої здатності відносно багатьох речовин, у тому числі й лікарських, минуло більше 40 років. Упродовж цих років ліпосоми інтенсивно досліджувалися й застосовувалися як моделі мембран, транспортних контейнерів, а також реакційних систем у біохімії, фармакології, імунології та біотехнології [31; 30; 29; 37; 44]. Більше того, ліпосоми – це й широко розповсюджений комерційний продукт. За даними реферативного збірника "Винаходи країн світу", опубліковано більш 670 патентних документів, що є результатом вивчення ліпосом [36]. У цій галузі лідирують Японія, США, ФРН, Франція, Великобританія та Швейцарія.

Використання ліпосом у наукових дослідженнях. Перше таке використання було пов'язано з моделюванням клітинних мембран. За допомогою ліпосом було встановлено основні закономірності транспорту речовин через мембрану, показано важливу роль фазових переходів у функціонуванні мембран, визначено молекулярні параметри ліпідного бішару та його динамічні характеристики, вивчено процеси злиття мембран, у реконструйованих системах охарактеризовано індивідуальні мембранні білки й цілі білкові ансамблі [5].

З теоретичного погляду дуже важливим і цікавим для розуміння структури та функцій біомембран є дослідження процесу вбудовування різних білків у модельні мембрани. Найактивніше білки вбудовуються в мембрану ліпосом за температури фазового переходу, тобто коли фосфоліпідні молекули є максимально не впорядкованими. Крім того, здатність білків вбудовуватися в мембрану визначається наявністю гідрофобної ділянки, яка виконує функцію якоря для білкової молекули [33].

Було здійснено реконструкцію багатьох мембранних систем, зокрема нікотинового ацетилхолінового рецептора з електричного органу ската *Torpedo californica*, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикула. Проведено включення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази еритроцитів до модельної мембранної системи та Na^+ , K^+ -АТФази нирок – до фосфоліпідних везикул. Методи реконструкції базуються на злитті мембранних систем та утворенні міжклітинних контактів.

Процеси злиття мембран вивчали з використанням ліпосом, що дозволило встановити цілу низку закономірностей [42]. Було встановлено, що ліпідні бішари можуть мимовільно зливатися, якщо вони перебувають у тісному контакті. Процес "перезамкнення" мембран проходить у дві

стадії: у першій виникає перемичка (сталк) між найближчими моношарами, яка розширюється, формуючи контактний бішар. Під час другої стадії відбувається перехід від напівзлиття до повного злиття в результаті руйнування контактної бішару, чому сприяє позитивна спонтанна кривизна віддалених моношарів і підвищений поверхневий натяг. Припускають, що злиття мембран ініціюється змінами в їхній структурі в результаті виникнення при наближенні ліпосом одна до одної внутрішньомембранного електричного поля, яке створюється зарядженими групами ліпідів. Такі зміни можна спрямовано індукувати дією ультразвуку, детергентів та органічних розчинників, а також введенням у систему іонів кальцію. Виявилось, що Ca^{2+} нейтралізує поверхневий заряд мембранних фосфоліпідів, утворюючи з ними комплекс у співвідношенні 1 : 4. Усі зовнішні чинники, які змінюють плинність бішару мембрани, наприклад, механічне напруження, детергенти, осмотичний тиск, наявність іонів, здатні впливати на процеси злиття як штучних, так і клітинних мембран.

Припускають, що мембрани можуть взаємодіяти за такими принципами: по-перше, шляхом неповного злиття ліпосом з бішаровими ліпідними мембранами з утворенням бішару-гібриду (зовнішня мембрана ліпосом та їх ділянок в бішарову мембрану); по-друге, шляхом повного включення ліпосом та їх ділянок в бішарову мембрану; по-третє, вмонтовуванням ліпосом у бішар, по-четверте, за рахунок адгезії (рис. 30). Вважається, що адсорбція ліпосом на мембранних бішарах відбувається за рахунок електростатичних сил. Отже, під час злиття між контактуючими мембранами або виникає перемичка, або відбувається руйнування моношарів всередині утвореної структури.

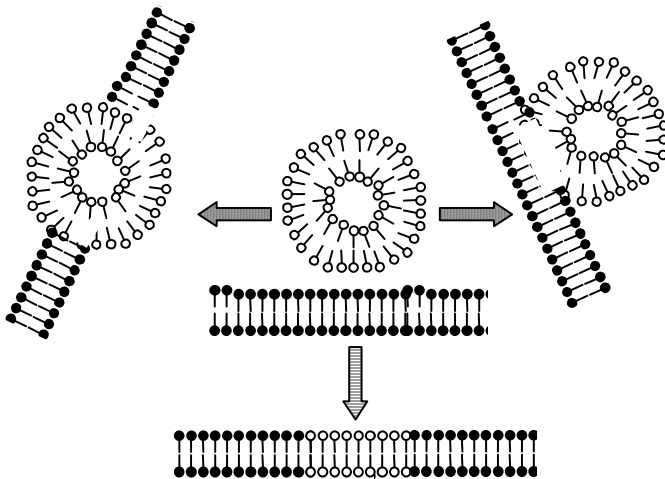


Рис. 30. Механізми злиття ліпосом з бішаровими ліпідними мембранами

Останнім часом на ліпосоми й везикули звернули увагу представники інших фундаментальних наук. Математиків цікавлять проблеми топології двовимірних поверхонь у тривимірному просторі у зв'язку з пружними властивостями ліпідного бішару. Увагу фізиків ліпосоми привертають як фрактальні системи зі специфічною поведінкою при агрегації й багатством морфологічних перетворень. Для хіміків бішарові везикули цікаві як мікрореактори, що дозволяють проводити хімічні реакції в орієнтованих середовищах з можливістю просторового поділу реагентів і продуктів реакції за допомогою мембран. Фахівці в галузі матеріалознавства вважають ліпосоми прекрасною основою для створення нових композитних матеріалів з високої біосумісністю. Цей перелік можна продовжити, але і так зрозуміло, що ліпосоми й везикули як об'єкт дослідження обіцяють у майбутньому багато цікавих відкриттів.

Використання ліпосом у фармакології та медицині. На даний час цей напрям практичного використання ліпосом розвивається найбільш активно. Здатність ліпосом містити в собі різноманітні речовини практично без якихось обмежень відносно їхньої хімічної природи, властивостей і розміру молекул надає унікальні можливості для розв'язання деяких медичних проблем [41]. За оцінками американських фахівців, до 2000 р. сума продажів ліпосом як засобів транспортування становила 2–5 млрд доларів США, або 20–25 % світового ринку засобів доставки лікарських препаратів [14].

До 1971 р. ліпосоми використовувалися як моделі біологічних мембран з метою дослідження їхньої проникності. У 1971 р. було розпочато першу спробу включення в ліпосоми ферментів з наступним уведенням везикул у кровотік для корекції метаболічних порушень у печінці при глікогенозі. Надалі розроблялися ліпосомальні форми деяких протипухлинних препаратів, комплексонів, антибіотиків, гормонів [21]. При цьому виявилось, що ліпосоми є дуже перспективними засобами транспортування лікарських засобів, тому що вони є малотоксичними й легко піддаються біодеградації на відміну від полімерних систем контролюваного транспортування лікарських препаратів [38].

Багато лікарських препаратів мають низький терапевтичний індекс, тобто концентрація, в якій вони виконують лікувальну дію, мало відрізняється від концентрації, за якої препарат стає токсичним. В інших випадках лікарський препарат при введенні в організм може швидко втрачати активність під впливом інактивуючих агентів. Включення таких препаратів у ліпосоми може значно підвищити їхню терапевтичну ефективність, оскільки, з одного боку, препарат, який міститься в ліпосомі, захищений її мембраною від дії несприятливих факторів, а з іншого – та сама мембрана не дозволяє токсичному препарату перевищити припустиму концентрацію в біологічних рідинах організму [5]. Ліпосома в даному разі виконує роль сховища, з якого препарат вивільняється поступово, у потрібних дозах і впродовж певного проміжку часу.

З медичного погляду найцікавішим є вивчення взаємодії ліпосом з різними клітинами, які можна використовувати як моделі міжклітинних взаємодій. При такій взаємодії не тільки клітини захоплюють ліпосоми, а й ліпосоми можуть справляти на клітини помітний вплив, який залежить від складу ліпосомальних мембран [33].

Щодо біологічної сумісності, то ліпосоми є ідеальними переносниками лікарських препаратів [32]. Їх отримують з природних ліпідів, і тому вони нетоксичні, не викликають небажаних імунних реакцій, підлягають біологічній деградації, тобто руйнуються під дією звичайних ферментів, які присутні в організмі [21]. Ліпосоми ефективно захищають включені до них речовини від контакту із ферментними системами організму, запобігають передчасній інактивації препарату та забезпечують його поступовий вихід. Наприклад, швидко адсорбуючись шкірою, ліпосоми запобігають вимиванню біологічно активних речовин з поверхні шкіри, збільшуючи їх ефективну концентрацію й забезпечуючи пролонговану дію цих препаратів.

Водночас виявилось, що ліпосоми є недостатньо стабільними у крові і швидко виводяться з кровотоку макрофагами, які містяться в печінці, селезінці й кістковому мозку. Тому ліпосомальні носії зазвичай не вдається спрямувати саме в ті органи й тканини, де відбувається патологічний процес.

Які саме властивості ліпосом надають їм переваги перед іншими носіями ліків? Насамперед, це спорідненість з природними мембранами клітин за хімічним складом [22]. Відомо, що на ліпіди, які входять до складу мембран, припадає від 20 до 80 % їхньої маси. Тому за правильного добору компонентів ліпосом їх введення в організм не викликає негативних реакцій. Друга важлива властивість ліпосом – це універсальність. Завдяки напівсинтетичній природі можна широко варіювати їхні розміри, характеристики, склад поверхні [32]. Це дозволяє ліпосомам переносити широке коло фармакологічно активних речовин: протипухлинні й протимікробні препарати, гормони, ферменти, вакцини, а також додаткові джерела енергії для клітини, генетичний матеріал. Крім того, ліпосоми порівняно легко руйнуються в організмі, вивільняючи доставлені речовини, але на шляху проходження ліпосоми, самі позбавлені властивостей антигену, надійно вкривають і свій вантаж від контакту з імунною системою і тому не викликають захисних і алергічних реакцій організму.

Важливу роль відіграє також характер взаємодії ліпосом з клітинами (рис. 31). Вона може набувати різних форм, найпростіша з яких – ліпосоми адсорбуються (прикріплюються) на клітинній поверхні [38]. Далі ліпосоми можуть поглинатися клітинами шляхом ендоцитозу, і разом з ними всередину клітини потрапляють доставлені речовини. Нарешті, ліпосоми можуть злитися з мембранами клітини й стати їх частиною. При цьому можуть змінюватися властивості клітинних мембран: наприклад, їхня в'язкість і проникність, величина електричного заряду. Може також збільшитися чи зменшитися кількість каналів, які проходять через мембрани. Таким чином, завдяки ліпосомам з'являється новий спосіб спрямованого впливу на клітину, який можна назвати "мембранною інженерією".

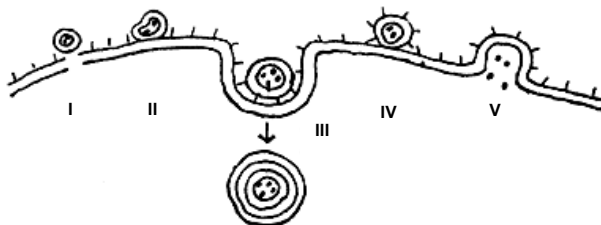


Рис. 31. Форми взаємодії ліпосом з мембраною клітини [22]

Ліпосома може збільшити проникність мембрани, викликаючи утворення додаткових каналів (I); може прикріпитися до мембрани клітини – адсорбуватися (II); може поглинатися клітиною – у цьому разі речовина, принесена ліпосомою, потрапляє безпосередньо у клітину (III); іноді клітинна мембрана і ліпосома обмінюються ліпідами (IV); в інших випадках мембрана ліпосоми й клітини зливаються (V).

Найперспективнішим напрямом використання ліпосомальних форм є лікування раку, причому з використанням таких сполук, які активізують захисні властивості самого організму [14]. Їх навантажували антрациклінами (речовинами, активними проти широкого кола злоякісних пухлин). Крім того, ліпосоми можна вводити підшкірно, а не внутрішньовенно, викликаючи сильнішу імунну відповідь. Ліпосоми істотно поліпшили терапевтичну ефективність протипухлинних препаратів і знизили їхню токсичність порівняно з вільними субстанціями.

На даний час великі можливості відкриваються відносно активного "адресування" ліпосомальних форм лікарських речовин до органів за допомогою зовнішніх фізичних впливів. Перспективний спосіб поєднання ліпосомального введення медикаменту з локальним нагріванням органа як у результаті спонтанного підвищення температури ураженої ділянки (пухлина, вогнище запалення), так і зовнішнього нагрівання за допомогою СВЧ.

Комбінування методів фізіотерапії з ліпосомальним введенням відкриває нові можливості у стоматології, коли за допомогою електрофорезу можливе спрямоване введення лікарських препаратів, які не мають електричного заряду.

Дуже перспективним є використання ліпосомальних форм препаратів для лікування внутрішньоклітинного паразитизму та інфекційних захворювань: ліпоїдного ретикульозу, шкірного лейшманіозу, грибкових захворювань криптококозу і істоплазмозу [21]. Сполуки сурми, токсичні для лейшманій, вносили в ліпосоми різного складу, причому виявилось, що включення препаратів сурми в ліпосоми робить ці препарати в 700 разів ефективнішими [14]. Очевидною є перспектива застосування ліпосомальних форм антипаразитарних препаратів також для лікування малярії й токсоплазмозу. Ліпосоми значно підвищують ефективність лікування черевного тифу (їх були використано для доставки макрофагам антибіотика цефалотину), а також бруцельозу (доставка антибіотика гентаміцину) [22].

Великі перспективи мають інкапсульовані в ліпосоми форми лікарських засобів, призначених для лікування офтальмологічних захворювань, зокрема пілокарпину й кромоліну, а також препарати для лікування інфекцій, викликаних грамнегативними бактеріями, у хворих на СНІД [14]. Ліпосомальні форми лікарських речовин як ад'юванти можуть підсилювати імунну відповідь на вакцину, зокрема, на протималарійну.

Актуальною уявляється й проблема інкапсульовання в ліпосомах і внутрішньоклітинного введення нуклеїнових кислот. У деяких лабораторіях отримано задовільні результати щодо включення нативної ДНК чи РНК у ліпосоми [64].

Таким чином, ліпосоми допомагають довше зберігати високий рівень концентрації лікарських препаратів у крові й у клітинах, а також дають їм змогу проникнути в ті ділянки, куди без ліпосом вони потрапити не можуть [41].

Форми взаємодії ліпосом з клітинами багато в чому зумовлюють їхню здатність долати деякі анатомічні бар'єри організму, зокрема стінки шлунково-кишкового тракту. Було зроблено спробу використовувати їх для лікування цукрового діабету, тобто вводити інсулін у ліпосомах через рот. Але поки що не зовсім зрозуміло, чому одні речовини, включені в ліпосоми, проходять крізь стінку кишечника, а інші – цього зробити не можуть. Механізм такого явища ще вивчається.

Використання ліпосом для точної, цілеспрямованої доставки лікарських речовин має, проте, й певні обмеження [41]. Зокрема, воно стримується їхньою хімічною нестійкістю й недостатньою стабільністю у кровотоці, недостатньою чистотою використаних для їх одержання природних фосфоліпідів, а також високою вартістю ліпосомальних форм уведення лікарських препаратів. Після потрапляння в організм велика частина ліпосом поглинається клітинами ретикулоендотеліальної системи (у печінці, селезінці, кістковому мозку, лімфатичних вузлах і кровотоці), яка складається в основному з макрофагів, які знищують чужорідні для організму частинки (рис. 32). Тому, якщо необхідно доставити ліпосоми в інші органи, використовують інші підходи, наприклад, зв'язування ліпосом з антитілами до білків-мішеней; при цьому велика їх частина встигає дістатися до місця призначення раніше, ніж відбудеться зустріч з макрофагом.

Для розв'язання цієї проблеми використовують також ліпосоми із сильно гідрофільною поверхнею за рахунок ковалентно зв'язаного синтетичного полімеру поліетиленгліколю (рис. 33), що призводить до підвищення осмотичного тиску навколо ліпосом і перешкоджає їх зближенню з клітиною. У результаті цього час життя ліпосом у кровотоці перевищує 2 доби. Ці ліпосоми одержали назву *пегільовані ліпосоми*, і вони є невидимими для клітин РЕС і довгий час циркулюють у крові [6]. Їх також називають "ліпосоми-невидимки" (англ. *stealth liposomes* за аналогією з відомим літаком "Стелс", який не вдається знайти за допомогою радарних установок [22]).

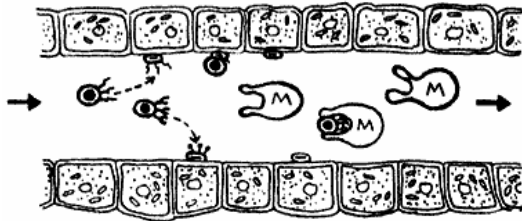


Рис. 32. Стратегія введення ліпосом у кровотік [22]

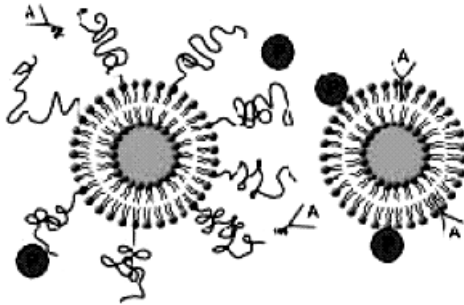


Рис. 33. "Ліпосоми-невидимки"

Поліетиленгліколь з молекулярною масою 1,5–5 кДа ковалентно зв'язували із фосфатидилетаноламіном, і такий кон'югований ліпід у кількості не більше 10 % включали в ліпосоми. Вважають, що сильно гідратована полімерна "шуба" утруднює адсорбцію антитіл (А) та інших захисних білків (Р) на поверхні таких ліпосом, у результаті чого макрофаги не сприймають їх як чужорідні частинки, що підлягають видаленню

Оригінальним напрямом у ліпосомології є розробка нового покоління лікарських препаратів – імуноліпосом. Імуноліпосоми – це ліпосоми, до яких прикріплені моноклональні антитіла (МКА) [6; 47]. МКА забезпечують специфічне зв'язування ліпосом з антигенпозитивними клітинами, а ліпосоми доставляють відповідний гідрофобний чи гідрофільний хіміотерапевтичний препарат.

На даний час розрізняють три типи імуноліпосом: А, В та С. В імуноліпосомах типу А МКА ковалентно зв'язані зі звичайними ліпосомами за допомогою короткого якоря. Тип В – це пегільовані ліпосоми, в яких МКА також ковалентно зв'язані з ними за допомогою короткого якоря. Тип С (Pendant-type PEG-immunoliposomes) – це стержично стабілізовані поліетиленгліколь (ПЕГ) ліпосоми, в яких МКА прикріплені до дистального термінального кінця ПЕГ.

За допомогою ліпосом типу А було переконливо продемонстровано, що імуноліпосоми більш ефективно доставляють ліки до клітин-мішеней порівняно зі звичайними ліпосомами в тестах як *in vitro*, так і *in vivo*. Од-

нак зв'язування імуноліпосом з клітинами-мішенями *in vivo* було більш складним: прикріплення до ліпосом антитіл підсилювало їх захоплення мононуклеарами ретикуло-ендотеліальної системи (РЕС). Захоплення імуноліпосом клітинами РЕС, а також наявність ендотеліального бар'єра, який відділяє судинне русло від пухлинної тканини, спонукали дослідників до створення стерично стабілізованих імуноліпосом з подовженим періодом циркуляції у крові [6].

На сьогодні описано кілька препаратів імуноліпосом, потенційно перспективних для застосування в онкологічній практиці [83]. Вони спрямовані проти клітин, які експресують антигени CD71 (рецептор трансферину), Her2/neu (рецептор епідермального фактора росту), HLA-DR (антигени гістосумісності II класу), CD19 (загально-В-клітинний маркер), LL2 (антиген В-клітинної лімфоми) та ін.

Крім того, імуноліпосоми стали використовувати для створення імуномагнетиків з метою фракціонування CD34-позитивних стовбурових клітин людини [89], для створення імунодіагностикумів і т.д.

Застосування ліпосом у медицині не обмежується традиційною хіміотерапією. Ліпосоми більш перспективні в поєднанні з новим поколінням ліків, створених завдяки успіхам білкової й генної інженерії. Як відомо, генетична інженерія заснована на введенні фрагментів ДНК у клітини, для того щоб змусити їх продукувати потрібні білки чи поліпептиди. Використання для цієї мети ліпосом, які містять "лікувальні гени", може виявитися корисним для терапії спадкових захворювань, зумовлених дефектами генів, які кодують життєво важливі білки [40].

За допомогою ліпосом в організм можуть бути також уведено різні білки, зокрема ферменти (при ензимотерапії) і цитокіни (для корекції імунного статусу організму). Ведуться роботи із створення гемоглобінвмісних ліпосом (гемосом) з метою одержання штучних заміників крові.

Серйозну проблему становить стерилізація ліпосом. Поки що найбільш прийнятним способом можна вважати стерилізацію ліпосом за допомогою таких фільтрів, пори яких пропускають тільки молекули ліпідів і затримують мікроорганізми [22]. Дуже важливі також терміни збереження ліпосом після їх приготування.

Підсумовуючи вищесказане, можна стверджувати, що ліпосоми є дуже перспективними носіями для цілеспрямованої доставки лікарських засобів, тому що вони є малотоксичними й здатні до біодеградації. Основними напрямками діяльності в цій галузі є фундаментальні дослідження проникності двохшарових мембран ліпосом, вивчення підвищення стабільності й однорідності їхнього складу, а також технологічні розробки з метою здешевлення виробництва ліпосомальних форм введення лікарських препаратів.

Успіхи в розробці й застосуванні ліпосомальних препаратів медичного призначення є досить значними. У даний час вони є предметом пильної уваги з боку багатьох фармацевтичних компаній, які інвестують знач-

ні кошти в цю галузь. Очевидно, недалекою є той час, коли будуть широко представлені різноманітні ліпосомальні препарати, призначені для лікування хвороб, які сьогодні здаються невиліковними.

Використання ліпосом у косметології. У косметичній промисловості першими ліпосоми застосували французькі косметичні компанії, створивши в 1986 р. крем з ліпосомами "Capture" ("Cristian Dior Parfums", Paris) і крем для шкіри ("L'OREAL", Paris). Перший вітчизняний гель з ліпосомами "Revelle" було створено в 1993 р. на базі російської фармацевтичної компанії "Д. Мазай". Сьогодні засобів, у яких використовуються фосфоліпідні везикули (ФЛВ), стало значно більше, чому сприяла поява на ринку готових ліпосомальних суспензій для введення в інертні основи як активних комплексів. Виявилось, що для косметичних цілей придатні найпростіші ліпосоми, виробництво яких не вимагає складного технологічного устаткування й дорогих вихідних матеріалів.

Сьогодні виробляються креми з ліпосомами для повсякденного догляду за шкірою, креми, які запобігають її старінню, засоби для догляду за шкірою після гоління, кондиціонери для волосся, парфуми, губна помада, сонцезахисні креми, засоби для засмаги, грим, інтимна й декоративна косметика. Основу всіх цих препаратів становить водна дисперсія ліпосом, як правило, багат шарових, які завдяки здатності утримувати воду є гарними зволожуючими агентами [5]. Для посилення корисних ефектів у рецептуру вводять добавки різних біологічно активних речовин, таких як вітаміни, антибіотики, білкові екстракти, фруктові кислоти.

У косметологічній галузі розроблено методи одержання ФЛВ, які дозволяють отримувати однорідну суспензію дрібних одношарових везикул із середнім діаметром 30–60 нм [16]. ФЛВ у різних готових косметичних і профілактично-гігієнічних засобах зберігають цілісність, а інкапсульовані компоненти – активність упродовж 2 років.

Для формування везикул найчастіше використовують фосфатидилхолін, оскільки він порівняно з іншими ліпідами має високий ступінь стабільності, а наявність водорозчинної й жиророзчинної ділянок забезпечує йому властивості природного емульгатора [45]. Ліпосоми із фосфатидилхоліну формуються просто, їх суспензії зберігають стабільність протягом тривалого терміну зберігання.

Отже, використання методу інкапсульювання біологічно активних речовин у ліпосоми дозволяє створювати біокомплекси активних речовин, які є стабільними упродовж усього терміну використання та зберігання; здійснювати цілеспрямовану доставку активних інгредієнтів; застосовувати мінімальну кількість активних речовин без втрати ефективності готової рецептурної форми; використовувати взаємопосилиючу дію жиророзчинних і водорозчинних компонентів [45].

Єдиної думки щодо механізмів сприятливого впливу косметичних препаратів з ліпосомами на шкіру на сьогодні не існує. Деякі дослідники стверджують, що в ліпосомальній формі біологічно активні речовини ле-

гше проходять через шкіру, тоді як інші вважають, що це не так і що ліпосоми гарні як інертний, не дратуючий шкіру матеріал, який приготований на водній основі й не містить у своєму складі спиртів, детергентів, олій та інших солубілізаторів неприродного походження [5].

Так, везикули легко вступають у взаємодію з мембранами клітин і забезпечують швидке усунення дефіциту фосфоліпідів. Найціннішою властивістю ФЛВ є те, що вони ініціюють репаративні процеси, як це було неодноразово показано при дослідженнях на бактеріях [29; 44], макрофагах [27], клітинах шкіри, печінки і легенів [30; 37]. Ефект репарації було виявлено навіть при використанні чистих фосфатидилхолінових везикул.

Існують дані про участь ліпосом у регуляції процесів старіння. Зокрема, ліпосоми із суміші фосфатидилхоліну загальної фракції ліпідів з томатів викликали геропротекторний ефект у популяції клітин мікоплазм. Крім того, цей комплекс виконував захисну функцію при сонячних опіках шкіри тварин і людини, що забезпечило створення відповідного косметичного засобу [16].

Таким чином, використання ліпосом у методі інкапсулювання дозволяє синтезувати високоефективні косметичні засоби на основі ліпофільних сполук без поверхнево-активних речовин.

Інше застосування ліпосом. Перспективним є застосування ліпосом у генотерапії: перенесення генетичного матеріалу за допомогою ліпосом було здійснено не тільки у клітини ссавців, але й у протопласти рослин, а також у клітини прокаріотів [40]. У деяких випадках ефективність трансформації клітин при використанні ліпосом була істотно вищою, ніж за допомогою інших методів, що дуже важливо щодо можливостей їх біотехнологічного застосування. У даний час деякі фірми виробляють спеціальні ліпосомальні реагенти для трансфекції, тобто введення ДНК, РНК та інших макромолекул у клітини різного типу [44].

Ліпосоми також використовуються для діагностичних а аналітичних цілей. У ліпосоми можна включати радіоактивні, рентгеноконтрастні, парамагнітні речовини, а також речовини, які відбивають ультразвук, для того, щоб поліпшити якість зображень, одержаних такими методами діагностики, як комп'ютерна томографія, рентгенографія, сцинтиграфія й ультразвукове зондування [31].

Використання ліпосом у технологічних процесах харчової промисловості ґрунтується на їхній здатності солубілізувати ліпіди у воді, захищати їх від несприятливих факторів середовища й вивільняти в потрібний час [5]. Так, у сироварінні використання ферментів у ліпосомальній формі дозволило скоротити час дозрівання сиру (для чого іноді потрібно близько року) на 30–50 %. Крім того, завдяки більш високій дисперсності ліпосомальних препаратів значно поліпшилися смакові якості сиру та його консистенція.

Деякі екологічні проблеми може бути вирішено за допомогою ліпосом. Так, ефективність використання мікроорганізмів для біологічного розкладання органічних відходів і промислових забруднень залежить від

забезпечення мікроорганізмів речовинами, необхідними для їх росту й розмноження. У цьому випадку ліпосоми може бути використано для доставки клітинам відсутніх поживних елементів, мінеральних добавок і ростових речовин. Крім того, при нафтових забрудненнях додавання ліпосом значно полегшує видалення нафти з поверхні води та з ґрунту.

Ліпосоми є ефективним засобом видалення з рідких середовищ токсичних і радіоактивних металів. Використання ліпосом у виробництві фарб і лакофарбових матеріалів дозволяє відмовитися від застосування екологічно шкідливих органічних розчинників.

Сьогодні розробляються методи одержання штучних везикул із синтетичних амфифільних сполук. Показано, що ліпосомоподібні везикули може бути виділено з великої кількості різноманітних органічних речовин за умови, що їхні молекули побудовані відповідно до принципу амфифільності, тобто містять угруповання, які мають спорідненість з водою, й ділянки, які мають гідрофобний характер [5]. Такі синтетичні везикули, як і справжні ліпосоми, зберігають усі властивості оболонкових структур, включаючи їхню морфологічну розмаїтість, і в багатьох випадках можуть прекрасно замінити ліпосоми, створені з природних матеріалів.

Наведені дані показують, що ліпосоми мають велике теоретичне й практичне значення: вони не тільки є інструментом для наукових досліджень, а й переходять у розряд продуктів великомасштабного виробництва.

РОЗДІЛ 2

ОСНОВНІ МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

1. ВИДІЛЕННЯ КЛІТИН З РІЗНИХ ОРГАНІВ

1.1. ВИДІЛЕННЯ ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН З ТИМУСУ Й СЕЛЕЗИНКИ ЩУРІВ [59]

Метод базується на виділенні лімфоїдних клітин із суспензії органів тварин шляхом центрифугування на градієнті фікол-вірографіну.

Матеріали й реактиви

Буфер для виділення: Готують розчин такого складу: NaCl (120 ммоль/л), KCl (5 ммоль/л), Na₂HPO₄ (3 ммоль/л), HEPES (5 ммоль/л), глюкоза (10 ммоль/л), NaHCO₃ (4 ммоль/л), доводять рН до 7,4. Після цього додають по 1 мл CaCl₂ (1,2 ммоль/л) і MgSO₄ (1 ммоль/л).

Приготування фіколу: 4,5 г "Ficoll-400" розчиняють в 50 мл гарячої дистильованої води. Додають 20 мл 65 % розчину йодаміду (N-метил-глюкамінової солі 3-ацетамідометил-5-ацетамідо-2,4,6-трийодбензойної кислоти), суміш перемішують до утворення прозорого розчину. Вимірюють густину розчину у рефрактометрі. Кінцевий об'єм фіколу (100 мл) доводять поступово, досягаючи густини 1,077 г/см³.

Хід роботи

Тварин декапітують, видаляють селезінку й тимус, органи переносять у пробірки чи склянки з налитим в них буфером виділення.

Виділення лімфоцитів

1. Селезінки зважують (по 450–600 мг), наважки вносять у чашки Петрі з налитими в них 10 мл буфера виділення .

2. Органи дезінтегрують без використання ферментів і перетирають крізь чотири шари нейлонової тканини в буферне середовище, отримуючи суспензію клітин.

3. Суспензію клітин доводять до об'єму 10 мл буфером виділення, відстоюють протягом 10 хв (для позбавлення від великих клітин і сторонніх частинок), осад відкидають.

4. Суспензію клітин вносять в інші мірні пробірки, доводять об'єм до 10 мл буфером виділення, осад відкидають.

5. Фракцію лімфоїдних клітин, яка складається в основному з малих і середніх лімфоцитів, виділяють з надосадової рідини центрифугуванням в градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077 г/см³). Для цього в товстостінній центрифужній пробірці вносять 5 мл клітинної суспензії й обережно підшаровують 2,5 мл розчину фіколу.

6. Проби центрифугують за 1500 об/хв упродовж 40 хв, фракцію лімфоїдних клітин, яка утворюється на межі між фіколом і суспензією клітин селезінки, збирають і переносять в інші пробірки.

7. Отримані лімфоцити відмивають від фіколу: доводять об'єм до 10 мл вищевказаним буфером, центрифугують за 1,5 1500 об/хв упродовж 10 хв, осад ресуспендують у 10 мл буфера і знову відмивають, як зазначено вище.

8. Осад ресуспендують у 1 мл буфера виділення й підраховують клітини в камері Горяєва після фарбування трипановим синім.

9. Проби заморожують у рідкому азоті.

Виділення тимоцитів

1. Тимуси перетирають крізь чотири шари нейлонової тканини в буферне середовище вищевказаного складу (буфер виділення).

2. Суспензію клітин доводять до об'єму 10 мл буфером виділення та відстоюють протягом 10 хв.

3. Центрифугують за 1500 об/хв упродовж 10 хв.

4. Осад ресуспендують в 1 мл буфера виділення і підраховують клітини в камері Горяєва після фарбування трипановим синім.

5. Проби заморожують у рідкому азоті.

1.2. ВИДЛЕННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗОВИХ КЛІТИН [33]

Обладнання

Магнітна мішалка, оптичний мікроскоп із фазово-контрастним пристроєм, ультразвуковий дезінтегратор, спектрофотометр.

Матеріали й реактиви

Трипсин, колагеназа, трипановий синій, АТФ.

Розчин І. Модифікований розчин Хенкса: NaCl (137 ммоль/л), KCl (5 ммоль/л), Na₂HPO₄ (1,1 ммоль/л), K₂HPO₄ (0,4 ммоль/л), NaHCO₃ (0,4 ммоль/л), глюкози (5,5 ммоль/л), іони Ca²⁺ і Mg²⁺ відсутні.

Розчин II. NaCl (137 ммоль/л), KCl (5 ммоль/л), NaHCO₃ (4,0 ммоль/л), глюкоза (5,5 ммоль/л), CaCl₂ (5,0 ммоль/л). Розчини готують на трис-НСІ буфері (рН 7,3 за 37 °С).

Хід роботи

1. У тварини беруть тканину (*taenia coli* морської свинки), промивають розчином I (4 °С), розрізають на шматочки розміром 0,5–1 мм і протягом 1–1,5 год витримують за кімнатної температури в розчині I, до якого доданий ЕГТА (0,3–0,5 мг/л). ЕГТА діє як релаксант та ефективно "готує" тканину до подальшої дії колагенази. Шматочки тканини переносять у бюкс з магнітом, який міститься в ньому, і заливають 5–10 мл свіжо приготованого розчину трипсину (на розчині I, концентрація 1 мг/мл). Бюкс поміщають у термостат (36 °С) на магнітну мішалку при обертанні магніту зі швидкістю 50–60 об/хв.

2. Через 1 год перетравлювання інгібують соєвим інгібітором трипсину (3 мг/мл). Потім розчин трипсину замінюють розчином колагенази (0,4–0,5 мг/мл, приготованим на розчині II, в якому містяться іони Ca²⁺, які активують колагеназу). Через 30–40 хв клітинну суспензію осаджують центрифугуванням (1000 об/хв), і осад, який складається з ізольованих клітин, ресуспендують у розчині I.

3. Перед тим, як використовувати ізольовані клітини, необхідно впевнитися, що процедура ізолювання не змінила їхню структуру та властивості. Для цього виділяють такі критерії: а) цілісність плазматичної мембрани; б) спонтанна й викликана фізіологічно активними речовинами скоротлива активність; в) зберігання клітинами ультраструктурних особливостей інтактної гладенької м'язової тканини; г) спонтанна скоротлива активність ізольованих клітин досліджується в полі зору оптичного мікроскопа із фазово-контрастним пристроєм при збільшенні 80–100. Зазвичай вона спостерігається в 1–2 % випадків.

2. ВИЗНАЧЕННЯ ЦІЛІСНОСТІ КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ [33]

Матеріали й реактиви

0,4 % трипановий синій в 0,9 % NaCl, буфер виділення (див. розділ 2, 1.1).

Хід роботи

До суспендованих клітин (20 мкл) додають 100 мкл трипанового синього та 80 мкл буфера виділення. Суміш наносять на камеру Горяєва й препарати розглядають під мікроскопом. Живі клітини трипановий синій не забарвлює, оскільки він не здатен проходити крізь їхню мембрану. Наявність синього забарвлення свідчить про пошкодження плазматичної мембрани і, як наслідок, про загибель клітин.

3. РУЙНУВАННЯ КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ УЛЬТРАЗВУКОМ [33]

Матеріали й реактиви: ультразвуковий дезінтегратор УЗДН-1.

Хід роботи

Клітинну суспензію піддають ультразвуковій обробці упродовж 1 і 3 хв на частоті 22 кГц ультразвуковим дезінтегратором. До суспензії додають трипановий синій і визначають забарвлення клітин під мікроскопом.

4. ВИДІЛЕННЯ РІЗНИХ СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЙ

4.1. ВИДІЛЕННЯ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН

4.1.1. Виділення плазматичних мембран з клітин гладеньких м'язів [33]

Матеріали й реактиви

Сахароза (0,25 моль/л), ЕДТА (0,1 моль/л), 1 мм дитіотреїтол, 5 мм імідазол-НСІ (рН 7,2), 0,4 н розчин NaOH, 2 % розчин Na₂CO₃, 2 % тартрату натрію, 1 % розчин CuSO₄, реактив Фоліна, 10 % розчин гідроксиду натрію (не містить домішок карбонатів, для чого його готують шляхом розведення 75 % розчину гідроксиду натрію, в якому карбонати нерозчинні, у прокип'яченій дистильованій воді, звільненій від CO₂), сульфат міді CuSO₄ · 5H₂O, тартрат натрію-калію (сегнетова сіль) KOOC-CHON-CHON-CHON-COONa · 4H₂O, йодид калію.

Хід роботи

1. Усі операції під час виділення проводять за температури 1–4 °С. Виділені тонкі кишки кроля промивають холодною бідистильованою водою, очищають від сполучної тканини й зіскоблюють слизову. У дослідах використовують 50–60 г тканини від двох тварин.

2. Очищену та нарізану на шматочки тканину (1–1,5 см) гомогенізують за допомогою гомогенізатора впродовж 35 – 45 с. Середовище гомогенізації містить: сахарозу (0,25 моль/л); ЕДТА (0,1 моль/л); дитіотреїтолу (ДТТ) (1 ммоль/л); імідазола-НСІ (5 ммоль/л, рН 7,2). Вихідний об'єм гомогенату становить 350 мл. Об'єм гомогенату доводять середовищем гомогенізації до 550 мл і центрифугують (рис. 17) за 12 000 g 20 хв. Надосадову рідину фільтрують крізь три шари марлі та центрифугують 10 хв за 38 000 g.

3. Перші дві процедури дозволяють позбавитись фрагментів тканин, шматків клітин і великих органел (ядер, мітохондрій). Супернатант після

другого центрифугування фільтрують і центрифугують упродовж 60 хв за 145 000 g.

4. Отриманий осад ресуспендують у середовищі гомогенізації й центрифугують упродовж 120 хв за 95 000 g у ступінчастому (25 %, 30 %, 40 %) градієнті густини сахарози, що містить імідазолу-НСІ (5 ммоль/л, рН 7,2). Утворені білкові зони, локалізовані у верхніх шарах розчинів сахарози, відбирають і розводять у 20–25 разів середовищем гомогенізації й центрифугують з метою концентрування за 145 000 g упродовж 60 хв (ротор "РПУ-35").

5. Супернатант відкидають, а осад ресуспендують у середовищі зберігання, яке містить 25 % (за об'ємом) гліцерину, CaCl_2 (0,2 ммоль/л), ЕДТА (0,1 ммоль/л), імідазолу-НСІ (5 ммоль/л, рН 7,2) і зберігають за температури від 0 до $-5\text{ }^\circ\text{C}$.

Зберігання в середовищі з гліцерином надає можливість не піддавати фракцію плазматичних мембран згубному впливу процесів заморожування – розморожування. За такого зберігання enzymатичні активності плазматичних мембран (табл. 4) не змінюються протягом тривалого часу. Кількісний вихід даної фракції визначають за концентрацією білка.

Найчастіше активність ферментів, що є маркерами плазматичної мембрани (5'-нуклеотидази, Mg^{2+} -АТФази, Na^+ , K^+ -АТФази та ін.), є максимальною у фракціях, отриманих на 35 і 30% розчинах сахарози. Виходячи з цього, для подальшої роботи доцільно обирати фракцію плазматичної мембрани, отриману на 30% розчині сахарози.

4.1.2. Виділення плазматичних мембран з печінки мишей

Плазматичні мембрани можна також виділити з печінки мишей С57BL/6J за допомогою методу центрифугування у градієнті густини сахарози [8; 86]. На всіх етапах процедури виконують за температури 0–4 $^\circ\text{C}$. Основним середовищем є NaHCO_3 (0,001 моль/л). Даний метод дозволяє одночасно обробити три проби по 10 г печінки. Застосування гіпотонічного розчину, позбавленого двовалентних катіонів, дозволяє руйнувати клітини з мінімальною фрагментацією їхніх оболонок, у результаті чого значно знижується кількість пухирців, що утворюються з мембран і потрапляють у мікросомальну фракцію. Руйнування клітин контролюють за допомогою фазово-контрастного мікроскопа.

Матеріали й реактиви

1. Основне середовище: NaHCO_3 (0,001 моль/л); розчини сахарози (концентрація $69\pm 1\%$; $42,3\pm 0,1\%$; $50\pm 1\%$).

2. Розчини сахарози для створення лінійного градієнта (концентрація 27 – 30 %).

Хід роботи

1. Декапітують таку кількість мишей, яка є достатньою для отримання 10 г печінки. Виділяють з печінки жовчний міхур (не пошкодивши його) і сполучну тканину. Печінку поміщають у стакан, охолоджений у льодяній бані, і подрібнюють ножицями.

2. Поміщають 10 г подрібненої печінки у великий гомогенізатор Даунса, додають 25 мл основного середовища. Гомогенізують тканину за 4 °С сьома енергійними рухами товкача. До гомогенату додають 250 мл основного середовища (4 °С), перемішують упродовж 2 хв і фільтрують спочатку крізь два, а потім крізь чотири шари марлі.

3. Розподіляють гомогенат на дві частини між скляними центрифужними стаканами (заздалегідь не охолодженими) на 250 мл і центрифугують упродовж 10 хв за 1500 g, використовуючи ротор з підвісними стаканами.

4. Надосадову рідину обережно зливають, а її осад видаляють з перевернутого центрифужного стакана за допомогою фільтрувального паперу. Переносять осад у великий гомогенізатор Даунса.

5. Гомогенізують осад трьома рухами товкача.

6. Доводять вихідний розчин сахарози до концентрації 69 ± 1 % за допомогою рефрактометра. Наливають 11 мл розчину сахарози в циліндр на 50 мл й охолоджують у ємкості з льодом. Додають цей розчин до гомогенату (стадія 5). Доводять об'єм до 20 мл водою (4 °С). Енергійно перемішують суспензію паличкою доти, поки не утвориться однорідна суміш. За допомогою рефрактометра водою або 69 % сахарозою доводять концентрацію сахарози в гомогенаті до $44,0 \pm 0,1$ %.

7. Переливають 20 мл гомогенату у пробірку, зверху на гомогенат обережно нашаровують 10 мл сахарози з концентрацією $42,3 \pm 0,1$ % (концентрацію перевіряють за допомогою рефрактометра).

8. Усі три пробірки врівноважують з точністю до $\pm 0,005$ г, додаючи до них 42,3 % сахарозу.

9. Вставляють пробірки в попередньо охолоджений бакет-ротор "SW-25.1" і центрифугують їх упродовж 2 год зі швидкістю 90 000 $g_{\text{макс}}$. Необхідно бути обережним при роботі з пробірками, щоб не порушити поверхню розділу фаз з різною густиною.

10. Видаляють масу, яка розміщується на поверхні, шпателем. Додають 8 мл основного середовища. Для збільшення густини осаду центрифугують упродовж 10 хв за 25 000 $g_{\text{макс}}$.

11. Додають 1 мл основного середовища й ресуспендують осад.

12. Поміщають на дно силіконізованої пробірки S-25.1 4,1 мл 50 ± 1 % сахарози. Зверху над цим шаром формують лінійний градієнт густини сахарози (27–30 %). У приладі для створення градієнта використовують такі розчини сахарози: важкий – 30 %, легкий – 0 % (по 20 мл у шприцах ємністю 50 мл).

13. Зверху над градієнтом густини нашаровують ресуспендований гомогенат (~1,3 мл), центрифугують упродовж 1 год за 550 $g_{\text{макс}}$.

14. За допомогою шприца відсмоктують матеріал, розташований на поверхні розділу фаз між нижнім шаром і верхнім градієнтом. Розводять його основним середовищем до 9,2 мл. Отриману суспензію розливають по 1,5 мл у 6 маленьких пластмасових конічних пробірках з герметичними пробками й центрифугують упродовж 3 хв за 15 000 g, після чого надосадову рідину видаляють, осад заморожують за температури -70°C . Залишки мембран після розведення середовищем можна розглядати під фазово-контрастним мікроскопом.

4.2. МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ МІТОХОНДРІЙ

4.2.1. Виділення мітохондрій з печінки щурів

Мітохондрії відокремлюють від інших компонентів клітини методом диференційного центрифугування, отриманий матеріал субфракціонують у градієнті густини сахарози [33]. Ізотонічність середовища виділення забезпечується завдяки введенню трис-буфера або ЕДТА.

Матеріали й реактиви

Реактиви, необхідні для визначення концентрації білка за Лоури [80] (див. далі розділ 2, 5); реактив для перфузії печінки щурів – розчин гідрокарбонату натрію (1 ммоль/л) у розчині хлориду кальцію (5 ммоль/л); середовище для визначення мітохондрій: сахароза (0,5 моль/л), калійфосфатний буфер (0,15 моль/л) за рН 7,05, ЕДТА (0,5 ммоль/л), 1 % альбуміну; розчини для формування ступінчастого градієнта густини сахарози: 7 мл сахарози (1,1 моль/л), 15 мл сахарози (0,8 моль/л), 15 мл сахарози (0,5 моль/л) і 10 мл сахарози (0,3 моль/л), які готують на калійфосфатному буфері (0,15 моль/л) за рН 7,0, який містить ЕДТА (5 ммоль/л) і 1 % альбумін; сироватковий альбумін бика; 10 % розчин трихлороцтової кислоти; 1 н розчин NaOH.

Хід роботи

1. Щурів декапітують, фіксують на препарувальному столику й розрізають черевну порожнину. За допомогою канюлі, з'єднаною гумовою трубою з лійкою, заповненою охолодженим середовищем перфузованого розчину, печінку перфузують до повного видалення слідів крові в рідині, яка з неї витікає. Печінку видаляють, вирізають ділянки сполучної тканини й після просушування на фільтрувальному папері подрібнюють матеріал ножицями й пропускають крізь подрібнювач типу поршневої м'ясорубки. Отриману масу зважують і змішують з п'ятикратним (за масою) надлишком середовища виділення. Матеріал гомогенізують шляхом багаторазового перемішування тефлонового товкача зверху вниз, і навпаки.

2. Отриманий гомогенат віджимають крізь подвійний шар тканини (або марлі, яку складено в чотири рази) для видалення фрагментів тканини та

центрифугують за 2500–3000 г упродовж 10 хв. Осад, що містить залишки ядер та уламки клітин, відкидають. Надосадову рідину центрифугують за 15 000 г упродовж 15 хв. Осад промивають середовищем виділення й центрифугують у другий раз за 15 000 г також упродовж 15 хв.

3. Для наступного очищення мітохондрій осад суспендують у 2 мл середовища виділення й наносять на ступінчастий градієнт густини сахарози, що складається з таких шарів: 7 мл сахарози (1,1 моль/л), 15 мл сахарози (0,8 моль/л), 15 мл сахарози (0,5 моль/л) і 10 мл сахарози (0,3 моль/л). Ці розчини готують на калійфосфатному буфері (0,15 моль/л) за рН 7,0, який містить ЕДТА (5 ммоль/л) і 1 % альбумін.

4. Мітохондрії, що містяться в шарах сахарози (0,5–0,8 моль/л), відсмоктують шприцом або спеціальним пристосуванням для відбору фракцій і осаджують за 15 000 г упродовж 15 хв. Отриманий осад мітохондрій використовують у біохімічних і біофізичних експериментах.

У більшості випадків необхідно охарактеризувати отриманий матеріал або за сухою масою, або за вмістом білка. У першому випадку частину отриманої фракції висушують і зважують на склі, масу якого визначено заздалегідь. У другому – концентрацію білка у фракції мітохондрій визначають за методом Лоурі (див. далі розділ 2, 5).

4.2.2. Виділення мітохондрій з кори надниркових залоз бика

Метод базується на диференційному центрифугуванні для видалення з гомогенату ядерної та мітохондріальної фракцій [8]. На наступному етапі мітохондріальну фракцію промивають для видалення домішок (зокрема, еритроцитів і мікосом).

Матеріали й реактиви

Розчин сахарози (0,25 моль/л); середовище (рН 7,5): сахароза (0,25 моль/л), АТФ (1 ммоль/л) та бичачий сироватковий альбумін (0,1 %).

Хід роботи

1. Надниркові залози видаляють з убитих тварин якомога швидше й відразу ж занурюють в охолоджений розчин сахарози (0,25 моль/л), в якому їх переносять до лабораторії. Кору надниркових залоз зскрібають і дрібні шматочки тканини поміщають у стакан ємністю 50 мл, який містить середовище такого складу: сахароза (0,25 моль/л), АТФ (1 ммоль/л) і звільнений від жирних кислот бичачий сироватковий альбумін (0,1 %); рН середовища доводять до 7,5. Після зважування шматочки тканини подрібнюють гострими ножицями; чим дрібніші шматочки, тим швидше пройде гомогенізація і тим ліпшими будуть умови для виділення мітохондрій. У ході процедури середовище міняють два–три рази, щоб видалити кров.

2. Наважки тканини по 5 мг гомогенізують у 150 мл середовища в механічному гомогенізаторі Поттера зі швидкістю 1250 об/хв доти, поки в суспензії не залишаться видимих шматочків тканини.

3. Ядерну фракцію осаджують шляхом центрифугування впродовж 10 хв за 600 g. Мітохондрії отримують з надосадової рідини в результаті центрифугування за 1500 g упродовж 20 хв. Пухкий шар видаляють звичайним чином; осад повторно суспендують у половині об'єму середовища й центрифугують упродовж 10 хв за 3000 g. Процедуру повторюють із чвертю вихідного об'єму гомогенату; останній осад ресуспендують у сахарозі (0,25 моль/л) за концентрації білка 20–40 мг/мл.

Як і мітохондрії печінки, мітохондрії з кори надниркових залоз можуть окиснювати піруват і проміжні продукти в циклі Кребса, проте в них не окиснюється β -оксобутират і лише незначною мірою окиснюється глутат. Рівень забруднення ситохондріальних препаратів мікросомами визначають за вмістом у суспензіях мітохондрій глюкозо-6-фосфатази; отримані результати порівнюють з результатами аналізу суспензії мікросом, виділених з того самого гомогенату центрифугуванням постмітохондріальної надосадової рідини за 105 000 g упродовж 1 год. Якість мітохондріальних препаратів оцінюють за величиною P/O та рівнем дихального контролю. Отримані величини коефіцієнта дихального контролю (КДК) коливаються між 3 і 7 залежно від використаних субстратів. При застосуванні даного методу вихід становить приблизно 10 мг мітохондріального білка на 1 г сирої ваги тканини.

4.3. МЕТОДИ ВИДЛЕННЯ ЯДЕР

4.3.1. Виділення й очищення ядерних оболонок з печінки щурів за методом Харріса

У даному підході застосовується руйнування ядер шляхом обробки розчином з низькою іонною силою [8; 90]. Відомо, що за відсутності двовалентних катіонів ядра набухають і розриваються, у зв'язку із чим стає можливим виділення відносно інтактних тіней.

Метод базується на зональному та ізопікнічному центрифугуванні неочищеної ядерної фракції з печінки щура. Проте ці засоби центрифугування непридатні для очищених клітинних ядер, а тільки для неочищеної ядерної фракції (після центрифугування гомогенату за 1000 g), отриманої в результаті гомогенізації в розчині бікарбонату натрію (1 ммоль/л, рН 7,2) та інкубації за 4°C упродовж ночі. На рис. 34 наведено схему проведення всіх етапів даної методики.

Матеріали й реактиви

Буферний розчин (сахароза (0,25 моль/л), $MgCl_2$ (2 ммоль/л), трис- HCl (10 ммоль/л) рН 7,4); розчин бікарбонату натрію (1 ммоль/л), 10 мкг/мл ДНКазу I ("Sigma", тип DN-100); трис- HCl (10 ммоль/л, рН 7,4);

розчини для створення переривчастого градієнта сахарози: 10 мл сахарози (2,0 моль/л), 10 мл сахарози (1,8 моль/л), 10 мл сахарози (1,5 моль/л) і 6 мл сахарози (0,25 моль/л) (усі розчини готують на буфері трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,4)).

Хід роботи

1. Печінку шести щурів, які підлягали голодуванню, гомогенізують у холодному буферному розчині такого складу: сахароза (0,25 моль/л), $MgCl_2$ (2 ммоль/л), трис-НСІ (10 ммоль/л), рН 7,4 за допомогою гомогенізатора. Гомогенат центрифугують за 1000 g; отриманий осад ресуспендують у насиченому розчині сахарози, доводячи її концентрацію до 2,2 моль/л (59 % в /о). Потім ядра осаджують за 100 000 g упродовж 2 год і двічі промивають у буфері, який використовується для гомогенізації, шляхом струшування за 1000 g.

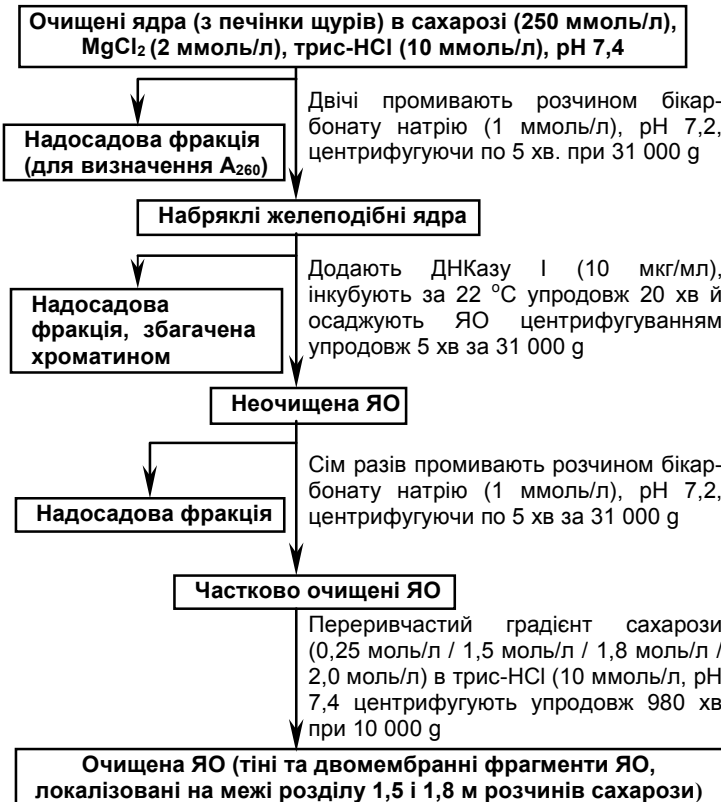


Рис. 34. Виділення й очищення ядерної оболонки (YO) з клітин печінки щура [8]

2. Очищені ядра, струшуючи, ресуспендують у 40 мл розчину бікарбонату натрію (1 ммоль/л, рН 7,2), залишають стояти 2 хв, а потім центрифугують за 31 000 г упродовж 5 хв. Осад ядер, що почали набухати, знову ресуспендують у розчині бікарбонату натрію (1 ммоль/л), обережно протягуючи його крізь голку великого діаметра, і після 5-хвилинної інкубації центрифугують, як описано вище. Отримують желеподібний осад, який не розчиняється при подальших промиваннях в розчині бікарбонату натрію (1 ммоль/л). Проте при інкубації з 10 мкг/мл ДНКазою I ("Sigma", тип DN-100) упродовж 20 хв за кімнатної температури (22 °С) желеподібна суспензія зруйнованих ядер легко розчиняється. Таким чином, у процесі цієї короткочасної інкубації ДНК, яка є дисперговою та доступною для ферменту, солюбілізується, а ядерна оболонка вільно суспендується й відокремлюється від хроматину.

3. ЯО повторно відмивають у розчині бікарбонату натрію (1 ммоль/л), центрифугуючи 5 хв за 31 000 г. На рис. 35 показано вивільнення хроматину у процесі послідовних промивань; видно, що після обробки ДНКазою I більша частина хроматину вивільнюється. Частково очищені ЯО, отримані після останнього промивання за допомогою диференційного центрифугування, суспендують у 2 мл трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,4), і центрифугують упродовж 5 хв за 500 г для видалення будь-яких агрегатів.

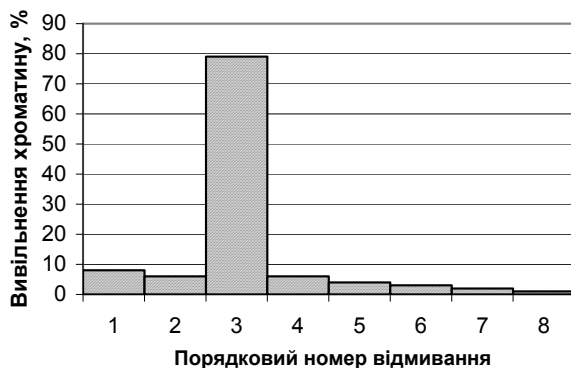


Рис. 35. Вивільнення розчиненого хроматину

(визначено за поглинанням за 260 нм надосадової фракції після центрифугування за 31 000 г) при послідовних промиваннях у розчині бікарбонату натрію (1 ммоль/л, рН 7,2) та інкубації з ДНКазою I, які застосовуються для попереднього відокремлення ЯО печінки щура від хроматину [8]. Найбільша частка вивільненого хроматину виявляється після обробки ДНКазою I (третє переосадження)

4. Невеликий безбарвний осад відкидають, а надосадову фракцію білого кольору, збагачену на мембрани, нашаровують на переривчастий градієнт сахарози, який містить 10 мл сахарози (2,0 моль/л), 10 мл саха-

рози (1,8 моль/л), 10 мл сахарози (1,5 моль/л) і 6 мл сахарози (0,25 моль/л) (усі розчини готують на буфері трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,4)). Градієнт центрифугують за 90 хв за 100 000 г. Основна смуга очищених ЯО локалізується на межі розділу між сахарозою концентрацією 1,5 і 1,8 моль/л. При продовженні центрифугування положення мембранної смуги не змінюється, а при ізопікнічному центрифугуванні у градієнті сахарози упродовж 20 год за 100 000 г також утворюється одна смуга мембран з плавучою густиною $1,12 \pm 0,01$, що узгоджується з величиною, отриманою методом зонального центрифугування.

5. При дослідженні отриманого препарату у фазово-контрастному мікроскопі виявляються ядерні тіні й великі двомембранні фрагменти ЯО у вільному стані та в суспензії. Також препарат досліджується шляхом електронної мікроскопії за допомогою методу тонких зрізів і негативного контрастування після попереднього видалення сахарози при промиванні трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,4) методом диференційного центрифугування.

4.3.2. Виділення ядерних оболонок з печінки щурів за методом Кауфманн

Метод базується на екстракції ядерних мембран розчинами з високою йонною силою, що дозволяє отримати ядерні оболонки, що добре збереглися та є слабко забрудненими гістонами та ДНК [77].

Матеріали й реактиви

Буфер 1: сахароза (0,25 моль/л), трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,4), $MgSO_4$ (5 ммоль/л); *буфер 2:* сахароза (2,1 моль/л), трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,4), $MgSO_4$ (5 ммоль/л); ФМСФ; ДНКаз I (250 мкг/мл); РНКаз А (250 мкг/мл); *буфер 3:* $MgSO_4$ (0,2 ммоль/л), трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,4), ФМСФ (1 ммоль/л); NaCl (2 моль/л); β -меркаптоетанол.

Хід роботи

1. Видаляють печінку з кількох щурів. Відмивають розчином, який містить сахарозу (0,25 моль/л), трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,4), $MgSO_4$ (5 ммоль/л) (буфер 1), подрібнюють і гомогенізують у гомогенізаторі Даунса (із слабко притертим товкачем). Фільтрують крізь муслінову тканину й центрифугують за 800 г упродовж 10 хв.

2. Двічі промивають осад, ресуспендуючи й центрифугуючи, як описано в п. 1.

3. Ресуспендують осад у буфері, який містить сахарозу (2,1 моль/л), трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,4), $MgSO_4$ (5 ммоль/л) (буфер 2), і нашаровують на основу з такої самої забуференої сахарози. Центрифугують за 70 000 г упродовж 60 хв (ротор "Beckman SW 27" або аналогічний) і збирають осад. Ще раз повторюють цю процедуру, щоб отримати ядра, використовуючи гомогенізатор Даунса для ресуспендування осаду.

4. Ресуспендують ядра й доводять до концентрації $5 \cdot 10^8$ / мл у буфері 1, до якого додають ФМСФ до концентрації 1 ммоль/л, та інкубують з ДНКазою I (250 мкг/мл) і прогрітою РНКазою А 60 хв. Центрифугують за 800 г упродовж 10 хв і збирають осад.

5. Ресуспендують ядра й доводять до концентрації $5 \cdot 10^8$ в 1 мл в розчині, який містить $MgSO_4$ (0,2 ммоль/л), трис-НCl (10 ммоль/л, pH 7,4), ФМСФ (1 ммоль/л) (буфер 3), і відразу ж додають NaCl (2 моль/л), розчинений у буфері 3, до концентрації 1,6 моль/л. Обережно помішуючи, додають β -меркаптоетанол до кінцевої концентрації 1 %. Витримують упродовж 15 хв і центрифугують за 16 000 упродовж 30 хв.

6. Знову екстрагують осад буфером 3 і NaCl, як описано в п. 5, але без додавання відновлюючого агента. Центрифугують за 16 000 г упродовж 30 хв, щоб отримати фракцію ядерних оболонок, яка містить в основному однакові порожні і, як правило, сферичні структури.

4.4. ОТРИМАННЯ МЕМБРАН АПАРАТУ ГОЛЬДЖІ З ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Даний метод є одним з варіантів швидкого отримання мембран апарату Гольджі з печінки щура, за якого мембрани з післяядерного супернатанту очищають у градієнті сахарози або перколу, де вони концентруються за низької густини [65].

Матеріали й реактиви

Розчин: сахароза (0,5 моль/л), 1 % декстран ("Sigma", середня молекулярна маса 252 000 Да), трис-малеат (38 ммоль/л, pH 5,4); сахароза (1,2 моль/л, приготована на трис-малеаті (38 ммоль/л, pH 6,4); Na_2CO_3 (100 ммоль/л, pH 11,0); трис-НCl (10 ммоль/л, pH 7,4).

Хід роботи

1. Гомогенізують печінки кожного щура в 26 мл розчину, яка містить сахарозу (0,5 моль/л), 1 % декстран ("Sigma", середня молекулярна маса 252 000 Да), трис-малеат (38 ммоль/л, pH 5,4), упродовж 60 с за 8000 об/хв у гомогенізаторі Поттера–Ельвейма або Даунса.

2. Центрифугують гомогенат за 6000 г упродовж 15 хв (ротатор "Sorvall SS-34" або аналогічний), збирають верхню жовтувато-коричневу частину осаду й ресуспендують її в 5–6 мл супернатанту.

3. Нашаровують порції по 1 мл на 7,5 мл сахарози (1,2 моль/л), приготованої на трис-малеаті (38 ммоль/л, pH 6,4), у вузькій пробірці для бакет-ротора ("Beckman SW 28") об'ємом 13 мл; зверху нашаровують дистильовану воду. Центрифугують за 97 000 г упродовж 30 хв і збирають грубу фракцію апарату Гольджі на межі розділу сахарози (1,2 моль/л) і нанесеної фракції. Збирають мембрани за допомогою шприца й осаджують центрифугуванням за 6000 г упродовж 20 хв.

4. Щоб відокремити мембрани апарату Гольджі від вмісту цистерн, ресуспендують фракцію приблизно в 5 мл Na_2CO_3 (100 ммоль/л, pH 11,0) і залишають за 4 °С на 30 хв. Концентрація білка має становити 0,02–1 мг/мл. Для екстракції придатним є маленький щільно притертий гомогенізатор Даунса. Центрифугують проби за 100 000 г упродовж 1 год (ротор "Beckman 50 Ti" або аналогічний) і ресуспендують осад у трис-НСІ (10 ммоль/л, pH 7,4).

Такий спосіб вивільнення вмісту цистерн є придатним також для мікросомальної фракції, пероксисом тощо. Аналогічно можна видалити рибосоми із шорсткого ендоплазматичного ретикулула. У результаті описаної процедури замкнені везикули перетворюються на плоскі листки, проте інтегральні білки зберігаються. Додавання до лужного середовища ФМСФ до концентрації 1 ммоль/л допомагає загальмувати протеоліз, який може мати місце за даних умов.

4.5. ВИДІЛЕННЯ МІКРОСОМ З ПЕЧІНКИ ЩУРІВ [8]

Матеріали й реактиви

Сахароза (0,25 моль/л); трис-НСІ буфер (0,15 моль/л, pH 8,0); міліпорний фільтр; 0,54 % розчин ДОХ (готують шляхом титрування розчину дезоксихолату натрію за 20 °С розчином НСІ до pH 7,5); розчин, який містить трис-НСІ буфері (50 ммоль/л, pH 7,4), КСІ (50 ммоль/л) і MgCl_2 (5 ммоль/л); гомогенізатор Поттера–Ельвейма; розчин, який містить 20 % сахарозу у трис-НСІ буфері (50 ммоль/л, pH 7,4), КСІ (50 ммоль/л) і MgCl_2 (5 ммоль/л).

Хід роботи

1. Гомогенізація печінки.

1.1. Печінку поміщають у холодний розчин сахарози (0,25 моль/л), зважують, а потім подрібнюють ножицями. Промивають кілька разів холодною сахарозою для якомога більш повного видалення крові.

1.2. Шматочки печінки суспендують у розчині сахарози, об'єм якого приблизно дорівнює об'єму печінки, суспензію переносять у гомогенізатор Поттера–Ельвейма з тефлоновими товкачем з механічним приводом і гомогенізують за чотириразового руху товкача вгору і вниз.

1.3. Гомогенат розводять розчином сахарози й доводять його концентрацію до 0,2–0,25 г вихідної сирової маси тканини на 1 мл суспензії.

2. Виділення й промивання загальної мікросомальної фракції.

2.1. Центрифугування проводять за температури 4 °С, у проміжках між окремими стадіями виділення отримані препарати поміщають у льодяну баню. Гомогенат центрифугують упродовж 20 хв за 10 000 г, надосадову рідину повністю зливають, а отриманий осад відкидають.

2.2. Надосадову рідину центрифугують упродовж 60–90 хв за 15 000 г, після чого її відкидають, а утворений осад ресуспендують у

трис-НСІ буфері (0,15 моль/л, рН 8,0) і центрифугують упродовж 1 год за 105 000 g.

2.3. Осад загальної мікросомальної фракції промивають і ресуспендують у сахарозі (0,25 моль/л), доводячи концентрацію приблизно до 1 г вихідної сирової маси тканини на 1 мл, що відповідає приблизно 20–25 мг мікросомального білка на 1 мл суспензії.

3. Перевірка на агрегацію.

3.1. Надосадову рідину, отриману шляхом центрифугування гомогенату за 10 000 g, можна використовувати для цього тесту без будь-якої обробки. Фракції мікросом розводять розчином сахарози (0,25 моль/л), доводячи концентрацію мікросомального білка до 5 мг/мл. Для зменшення агрегації на цій стадії слід уникати застосування високих концентрацій іонів, гіпотонічних середовищ і низьких концентрацій мікросомального білка.

3.2. 1–3 мл приготованої таким чином суспензії фільтрують під тиском крізь міліпоровий фільтр з відомим розміром пор. Кількість мікросом, які пройшли крізь фільтр, можна визначити, або вимірюючи поглинання фільтрату за 280 нм (якщо в ньому присутній тільки мікросомальний білок), або визначаючи відсотковий вміст у фільтраті якого-небудь мікросомального ферменту, наприклад, НАНФ:Н-дегідрогенази (якщо у фільтраті присутні також немікросомальні білки, наприклад, розчинні білки цитоплазми). Якщо мікросоми не підлягали значній агрегації, то крізь фільтр з діаметром пор 0,22 мкм вони зовсім не проходять; крізь фільтр з діаметром пор 0,3 мкм проходить 63 % мікросом, а крізь пори діаметром 0,45 мкм – 91 %.

4. Видалення немембранних білків, сорбованих в результаті руйнування мікросомальної мембрани під дією низьких температур.

4.1. Непромитий осад мікросом ресуспендують у трис-НСІ буфері (0,15 моль/л, рН 8,0) і центрифугують упродовж 1 год за 105 000 g. Отриманий осад мікросом ресуспендують у дистильованій воді, доводячи концентрацію мікросомального білка приблизно до 0,5–1 мг/мл, та інкубують за 30 °С упродовж 15 хв.

4.2. Після інкубації суспензію охолоджують у льодяній бані й центрифугують упродовж 1 год за 105 000 g. Утворений осад вдруге промивають трис-НСІ буфером (0,15 моль/л, рН 8,0) для видалення немембранних білків, адсорбованих на поверхні мікросом після виходу пухирців у результаті розриву мембрани під дією низьких температур.

5. Видалення немембранних білків за допомогою низьких концентрацій детергентів.

5.1. Вихідний 0,54 % розчин ДОХ готують шляхом титрування розчину дезоксихолату натрію за 20 °С розчином НСІ до рН 7,5. Промиті мікросоми ресуспендують у розчині, які містить трис-НСІ буфері (50 ммоль/л, рН 7,4), КСІ (50 ммоль/л) і MgCl₂ (5 ммоль/л). Можна ви-

користувати також KCl (500 ммоль/л), проте в цьому випадку концентрація вихідного розчину ДОХ має становити 0,28 %.

5.2. Суспензію гомогенізують ручним засобом у гомогенізаторі Поттера–Ельвейма й доводять концентрацію білка до 3–4 мг/мл. (Концентрацію білка у препаратах шорстких мікросом визначають таким чином: шорсткі мікросоми розчиняють в 0,5 % розчині ДОХ і вимірюють за 260 нм оптичну густину рибосомальної РНК, яка міститься в них. Оптична густина, яка дорівнює 6,75 од./мл, відповідає приблизно 1 мг білка в 1 мл. Концентрацію білка у фракціях загальних і гладеньких мікросом визначають за допомогою хімічних методів.)

5.3. При енергійному струшуванні до суспензії мікросом додають 1/10 об'єму вихідного розчину ДОХ, і препарат інкубують за 0 °С упродовж 30 хв. Після інкубації 8 мл суспензії нашаровують на поверхню 2 мл розчину, який містить 20 % сахарозу, трис-HCl буфер (50 ммоль/л, рН 7,4), KCl (50 ммоль/л) і MgCl₂ (5 ммоль/л), і центрифугують упродовж 90 хв за 50 000 об/хв. Після центрифугування мембрани виявляються в осаді, а немембранні білки залишаються у верхньому шарі розчину.

4.6. ВИДІЛЕННЯ ЛІЗОСОМ З ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

У даному методі очищення лізосом використовується ізоосмотичний градієнт, який формується за допомогою речовини метризаміду. Також у подібних підходах використовується найкоденз [7].

Матеріали й реактиви

Гомогенізатор Поттера–Ельвейма; розчин сахарози (0,25 моль/л); 45 % (1,25 г/мл) ізоосмотичний розчин метризаміду; розчини метризаміду для створення ізоосмотичного градієнта: 30, 26, 24 і 19 % (1,16, 1,145, 1,135 і 1,105 г/мл).

Хід роботи

1. Гомогенізують печінку щура, використовуючи гомогенізатор Поттера–Ельвейма (1000 об/хв, приблизно 5 циклів), при співвідношенні 1 г тканини на три об'єми розчину сахарози (0,25 моль/л) і центрифугують гомогенат за 1000 г упродовж 10 хв у роторі "Sorvall SS-34" або аналогічному йому.

2. Збирають супернатант і суспендують осад у трьох об'ємах сахарози (0,25 моль/л). Центрифугують за 1000 г упродовж 10 хв й об'єднують цей супернатант з попереднім.

3. Центрифугують об'єднаний супернатант за 3000 г упродовж 10 хв, потім утворений супернатант центрифугують за 10 000 г упродовж 20 хв, щоб отримати "легку мітохондріальну" фракцію. Ця груба фракція збагачена на лізосоми й мітохондрії, але містить також мембрани апарату Гольджі, пероксисоми і фрагменти ендоплазматичного ретикулула.

5. Ресуспендують цей осад (за допомогою гомогенізатора Даунса) в 45 % (1,25 г /мл) ізоосмотичному розчині метризаміду, щоб отримати густину 1,18 г/мл та об'єм приблизно 10 мл.

6. Нашаровують зверху (кожен шар по 6 мл) розчини метризаміду 30, 26, 24 і 19 % (1,16, 1,145, 1,135 і 1,105 г/мл) і центрифугують упродовж 2 год за 97 000 г (ротор "Beckman SW28" або аналогічний). Лізосоми концентруються в шарі з густиною 1,105–1,135 г/мл.

4.7. ОТРИМАННЯ СИНАПСОСОМ З МОЗКУ ЩУРІВ

Синаптосоми мозку є зручними мембранними структурами для дослідження властивостей маркерних ферментів плазматичних мембран, зокрема, транспортних АТФаз нервової тканини. Важливим для чистоти синаптосом є отримання неочищеної фракції грубих мітохондрій (ГМіт) за порівняно невисоких значень прискорення (10 000 g), щоб забруднення мікросомами у фракції ГМіт було мінімальним [39]. Перевагою використання синаптосом порівняно з дуже гетерогенною фракцією мікросом є її типово нейрональне походження й особливі функціональні властивості синаптичних мембран.

4.7.1. Метод диференційного отримання синаптосом у кутовому роторі

Матеріали й реактиви

Неочищена фракція грубих мітохондрій (ГМіт); сахароза (0,7 моль/л), сахароза (1,2 моль/л).

Хід роботи

1. Промиту в середовищі виділення фракцію ГМіт мозку щурів гомогенізують у холодній сахарозі (0,7 моль/л) і гомогенат центрифугують упродовж 2 год за 60 000 g у кутовому роторі. При цьому в надосадовій рідині, яка опалесціє, залишаються "важкі" мієлінові фрагменти, а в осаді – суміш мітохондрій і синаптосом.

2. Отриманий осад ретельно гомогенізують у сахарозі (1,2 моль/л) у скляному гомогенізаторі (вручну) і центрифугують упродовж 2 год за 60 000 g. Осад являє собою фракцію "чистих" (несинаптичних) мітохондрій.

3. Отриману рідину, яка опалесціє, обережно розводять у 3,75 рази холодною деіонізованою водою до отримання сахарози концентрації 0,32 моль/л і центрифугують упродовж 30 хв за 30 000 g. При цьому в надосадовій рідині виявляються "легкі" мієлінові фрагменти, а в осаді – збагачена фракція синаптосом.

Недоліком методу є тривалість виділення, що призводить до часткового руйнування синаптосом.

4.7.2. Прискорений метод виділення синапсом у градієнті густини фікол-сахароза

Матеріали й реактиви

Фракція ГМіт, 3 % фікол у сахарозі (0,32 моль/л) у співвідношенні 5/7 (о/о); сахароза (0,32 моль/л); 13 % фікол у сахарозі (0,32 моль/л) (у тому ж об'ємному співвідношенні).

Хід роботи

1. Промиту фракцію ГМіт ретельно суспендують у холодній сахарозі (0,32 моль/л) і нашаровують (повільно, піпеткою по стінці центрифужної пробірки) на 3 % фікол у сахарозі (0,32 моль/л) у співвідношенні 5/7 (о/о), після чого центрифугують за 68 000 г упродовж 30 хв.

2. Після видалення надосадової рідини (мієлінові фрагменти) осад, який містить мітохондрії й синаптосоми, відмивають від фіколу (68 000 г, 15 хв), сахарозою (0,32 моль/л), потім ретельно суспендують у сахарозі (0,32 моль/л), нашаровують на 13 % фікол у сахарозі (0,32 моль/л) (у тому самому об'ємному співвідношенні) й центрифугують за 68 000 г упродовж 30 хв.

3. На межі скошеного в кутовому роторі градієнта відбирають пастерівською піпеткою суспензію мікросом, а в осаді отримують "чисті" мітохондрії.

4. Далі синаптосоми (а за необхідності й мітохондрії) промивають від фіколу (68 000 г, 30 хв) холодною сахарозою (0,32 моль/л).

Синаптосоми, отримані за двома цими методам, не диференційовані за типом медіаторів, тобто не є сумарною фракцією синапсом.

4.7.3. Прискорений метод отримання диференційованих синапсом у градієнті густини сахарози в бакет-роторі

Матеріали й реактиви

Переривчастий градієнт густини сахарози (ч.д.а.) готують з рівних об'ємів сахарози (0,8, 1,0, 1,1, 1,2 моль/л). Градієнт готують із холодних розчинів сахарози повільним нашаровуванням за допомогою піпетки з відтягнутим кінцем по стінці холодної центрифужної пробірки; потім градієнт витримують упродовж 30–40 хв за 0–4 °С; сахароза (0,32 моль/л); сахароза (0,10–0,15 моль/л).

Хід роботи

1. На момент виділення фракції ГМіт створюють переривчастий градієнт густини сахарози.

2. Промиту фракцію ГМіт ретельно суспендують у холодній сахарозі (0,32 моль/л) (Гміт, отримана з 250–300 мг сирієї тканини мозку в 0,32 моль/л сахарозі). Якщо концентрація ГМіт буде більшою, то в результаті пере-

розподілу синаптичні структури забруднюються мієліновими фрагментами й мітохондріями.

3. Суспензію ГМіт обережно нашаровують на заздалегідь приготований градієнт і центрифугують у бакет-роторі за 130 000 г упродовж 30–40 хв. Відповідно отримують дві фракції: мієлінові фрагменти (на межі градієнта 0,32–0,8 моль/л), синаптичні мембрани, "легкі" й "важкі" синаптосоми і в осаді – "чисті" мітохондрії.

4. Матеріал фракцій розводять сахарозою (0,10–0,15 моль/л) й осаджують за 20 000 г (40 хв) або за 130 000 г (20 хв), суспендують у відповідному середовищі й зберігають за температури –20 °С.

Так звані "легкі" й "важкі" синаптосоми є відповідно холінергічними й нехолінергічними. Отримана таким чином фракція синаптичних мембран є недостатньо очищеною й містить домішки мієлінових фрагментів та аксонів (табл.12).

Таблиця 12. Вихід білка за фракціями й розподіл активності Na⁺, K⁺-АТФази, мкмоль/(год · мг білка) при інкубації упродовж 10 хв за 36 °С [40]

Показники	Мієлін	Синаптичні мембрани	"Легкі" синаптосоми	"Важкі" синаптосоми	"Чисті" мітохондрії
Білок, % від ГМіт	8	11	16	37	23
Активність Na ⁺ , K ⁺ -АТФази	9,7	27,4	19,8	9,6	5,6

Синаптосоми, виділені за допомогою описаних методів, становлять собою ізольовані нервові закінчення переважно аксосоматичних синапсів із сталою структурою. За даними електронної мікроскопії вони є мембранозамкненими утвореннями, в синаптоплазмі яких локалізовані синаптичні пухирці, синаптичні мітохондрії й, можливо, лізосомоподібні гранули.

4.8. ОТРИМАННЯ ФРАГМЕНТІВ САРКОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА

Фрагментований саркоплазматичний ретикулум (СР) являє собою один з найзручніших об'єктів для дослідження спряження активного транспорту іонів з гідролізом АТФ транспортною АТФазою. Фрагменти СР, виділені методом диференційного центрифугування з наступним очищенням розчинами з високою іонною силою (переважно КСl), являють собою замкнені везикули, які мають вбудовану в їхні мембрани транспортну Ca²⁺-залежну АТФазу й здатні у процесі гідролізу АТФ створювати градієнт іонів Са у внутрішніх порожнинах. Зручним джерелом фрагмен-

тів CP є поперековий м'яз кроля, який складається з волокон швидкого типу [39].

Матеріали й реактиви

Середовище виділення (NaCl (100 ммоль/л), гістидин (5 ммоль/л), рН 7,2); KCl (3 моль/л), приготований на середовищі виділення; розчин, який містить KCl (0,6 моль/л), гістидин (5 ммоль/л) за рН 7,2; середовище зберігання (сахароза (300 ммоль/л), 5 мг/мл альбуміну, гістидин (5 ммоль/л), рН 7,2); KCl (3 моль/л), приготований на середовищі виділення; розчин, який містить сахарозу (0,3 моль/л), гістидин (5 ммоль/л) і 1 мг/мл альбуміну (рН 7,2).

Хід роботи

1. Після декапітації тварин м'язи переносять у стакан з охолодженим середовищем виділення (NaCl (100 ммоль/л), гістидин (5 ммоль/л, рН 7,2), звільнюють від крові, сухожилок і жиру й подрібнюють ножицями.

2. Шматочки м'язів переносять у чотирикратний об'єм (P/V) середовища виділення й гомогенізують протягом 1 хв у блендері Уоринга.

3. Гомогенат центрифугують упродовж 1 год за 30 000 g, супернатант відкидають, а осад гомогенізують ще раз у тих самих умовах. Отриманий гомогенат піддають диференційному центрифугуванню, як описано нижче.

4. Міофібрили й уламки клітин осаджують за 2000 g упродовж 20 хв. Супернатант фільтрують крізь шість шарів марлі й центрифугують за 8000 g упродовж 20 хв, відкидаючи отриманий при цьому осад мітохондрій з деякими домішками незруйнованих триад ретикулума.

5. До надосадової рідини додають при перемішуванні розчин KCl (3 моль/л), приготований на середовищі виділення. Кінцева концентрація KCl має становити 0,5 моль/л. Через 30 хв екстракції, яку проводять при повільному перемішуванні, екстракт центрифугують за 45 000 g упродовж 1 год.

6. Осад фрагментів CP суспендують у гомогенізаторі Поттера з тефлоновим товкачем у 50 мл розчину, який містить KCl (0,6 моль/л), гістидин (5 ммоль/л) за рН 7,2, й екстрагують упродовж 1 год при перемішуванні (0–4 °C).

7. Фрагменти CP після екстракції центрифугують за 45 000 g упродовж 1 год, осад ресуспендують у середовищі зберігання (сахароза (300 ммоль/л), 5 мг/мл альбуміну, гістидин (5 ммоль/л), рН 7,2). Суспензію, яка містить близько 10 мг білка в 1 мл, зберігають за 0 °C або –20 °C.

Усі описані операції виконують на холоді, використовуючи охолоджені розчини, приготовані на бідистильованій воді; рН розчинів має відповідати потрібній величині за 0 °C. Використані солі (х. ч.) слід перекристалізувати. Вихід білка становить близько 0,5–1,0 мг/г тканини. Ca²⁺-акумулююча активність (у присутності оксалату) дорівнює 1000–2000 нмоль/(хв · мг білка) на наступний день після виділення й при зберіганні падає приблизно на 10 % за сім днів. Величина активності

Ca²⁺-залежної АТФази препаратів фрагментів СР коливається близько 1000 нмоль Р_n/(хв · мг білка) в день виділення й дещо зростає в наступні дні роботи.

Отриманий препарат фрагментів СР є достатньо гетерогенним за розміром везикул. Оскільки різні фармакологічні агенти справляють вплив на певні структурні частини СР, найчастіше виникає потреба порівняти препарати СР, які містять більш легкі (утворені переважно з порожнин СР, які легко руйнуються) та важкі (містять незруйновані тріади) фракції СР. Нижче описано методику окремого отримання "важких" і "легких" фрагментів СР.

Отримання "важких" і "легких" фрагментів СР

1. До стадії отримання гомогенату, який використовується для диференційного центрифугування, обробка тканини здійснюється таким самим чином. Після центрифугування гомогенату за 2000 г упродовж 20 хв концентрацію HCl у супернатанті доводять до 0,5 моль/л, додаючи до нього кристалічний KCl або розводячи його розчином KCl (3 моль/л), приготувавши на середовищі виділення.

2. Через 30 хв екстракції (у льоді при повільному перемішуванні) екстракт центрифугують за 11 000 г упродовж 20 хв, використовуючи отриманий осад для виділення "важкого" СР, а супернатант – для виділення "легкого" СР.

Обробка осаду для отримання "важких" фрагментів СР

1. Осад ресуспендують у 50 мл розчину, який містить сахарозу (0,3 моль/л), гістидин (5 ммоль/л) і 1 мг/мл альбуміну (рН 7,2), та екстрагують при перемішуванні на магнітній мішалці.

2. Суспензію центрифугують за 2000 г упродовж 20 хв, і осад відкидають. Супернатант піддають центрифугуванню за 15 000 г упродовж 20 хв і осад суспендують і зберігають, як описано.

Отриманий препарат містить уламки мітохондрій, проте вони не здатні акумулювати Ca²⁺ у середовищі з оксалатом.

Обробка супернатанту для отримання "легких" фрагментів СР

1. Супернатант центрифугують за 45 000 г упродовж 90 хв, осад суспендують у 50 мл середовища, яке містить сахарозу, гістидин й альбумін (див. вище), і після екстракції центрифугують за 45 000 г упродовж 60 хв.

2. Осад суспендують, використовуючи середовище зберігання, й заморожують.

5. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКА В МЕМБРАННИХ ПРЕПАРАТАХ ЗА МЕТОДОМ ЛОУРІ

Метод Лоурі є одним з найпоширеніших і найчутливіших методів визначення концентрації білка [80]. Він базується на вимірянні інтенсивності забарвлення розчину залежно від концентрації білка. Забарвлення розчину виникає внаслідок проходження двох біохімічних реакцій: біуретової та реакції реактиву Фоліна.

Біуретова реакція відбувається між пептидними зв'язками в білку та іонами міді з утворенням комплексної сполуки, яка має синьо-фіолетове забарвлення (рис. 36).

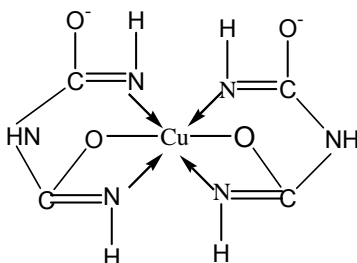
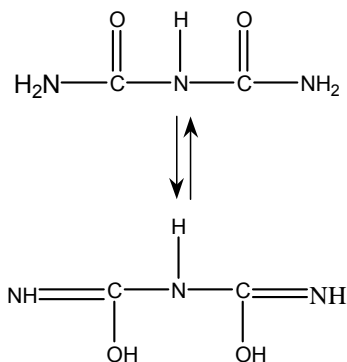


Рис. 36. Біуретовий мідний комплекс

У лужному середовищі дана сполука підлягає енолізації за такою схемою:



Дві молекули діенольної форми біурету взаємодіють з гідроксидом міді (II) й утворюють комплексну сполуку, в якій за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп існують координаційні зв'язки.

У другій реакції реактив Фоліна взаємодіє з тирозиновими й цистеїновими радикалами молекули білка. Ця реакція є відновленням суміші фосфорно-вольфрамової й фосфорно-молібденової кислот (реактив Фоліна) з утворенням комплексної сполуки синього кольору. Вважається, що в реакції відновлення беруть участь комплексні сполуки міді, які утворюються при взаємодії білка з лужним розчином мідного купоросу. Інтенсивність забарвлення, яке виникає, є пропорційною кількості пептидних зв'язків.

Метод Лоурі є високочутливим і дозволяє визначити кількість білка, яка виражена десятками мікрограмів.

Матеріали й реактиви

Реактив 1: 2 % розчин карбонату натрію, приготований на натрієвому лузі (0,1 моль/л); реактив 2: 0,5% розчин сірчанокислої міді, приготований на 1 % розчині цитрату натрію; реактив 3: 1 мл реактиву 2 змішують з 50 мл реактиву 1 (готується безпосередньо перед використанням); реактив Фоліна (1 н) перед дослідом розводять у два рази до вмісту кислоти 1 н, що перевіряють титруванням лугом за фенолфталеїном, і безпосередньо перед проведенням визначення приготований розчин розводять ще у два рази; розчин альбуміну, який містить 0,25 мг білка в 1 мл.

Хід роботи

1. У пробірки вносять досліджуваний розчин, який містить 10–100 мкг білка, доводять дистильованою водою до 0,4 мл (при визначенні білка в мембранній фракції рекомендується доводити об'єм до 0,4 мл 1 % розчином дезоксихолату натрію).

2. Додають 2 мл реактиву 3 і залишають за кімнатної температури на 20 хв.

3. Додають 0,2 мл реактиву Фоліна–Чокальтеу, змішують та інкубують упродовж 30–40 хв за кімнатної температури. Слід урахувати, що реактив Фоліна важчий за отриману суміш і може опускатися на дно, тому при додаванні реактиву Фоліна вміст пробірок слід перемішувати.

4. Вимірюють величину оптичної густини за 750 нм на спектрофотометрі чи на фотоелектроколориметрі, використовуючи відповідний світлофільтр.

Будують калібрувальний графік (рис. 37), в якому по осі абсцис відкладається значення концентрації білка у пробі (мкг), а по осі ординат – оптична густина розчину за довжини хвилі 750 нм.

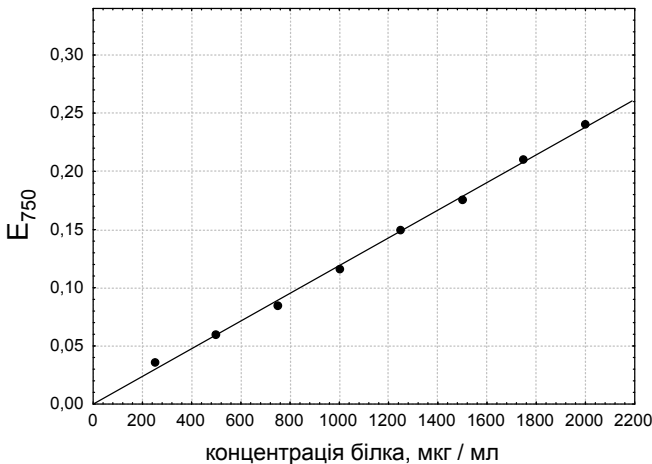


Рис. 37. Калібрувальний графік для визначення концентрації білка за методом Лоурі

При визначенні концентрації білка в мембранних препаратах до пробірок вносять 0,02 мл проби, доводять дистильованою водою до об'єму 0,4 мл і виконують всі вищевказані процедури. Вміст білка встановлюють за калібрувальним графіком, який будують з використанням чистого білка точно відомої концентрації.

Метод дає абсолютні дані тільки в тому разі, коли калібрувальний графік побудований за тим самим білком, який визначають шляхом цієї кольорової реакції. Для встановлення концентрації мембранних білків калібрувальний графік будують за бичачим сироватковим альбуміном.

Для встановлення концентрації за калібрувальним графіком необхідно з'єднати горизонтальною лінією отримане для даного білка значення оптичної густини на осі ординат з калібрувальною кривою і з точки перетину останнього на вісь абсцис опустити перпендикуляр. Точка перетину останнього з віссю абсцис вкаже вміст білка в мікрограмах у пробі.

Деякі сполуки заважають веденню роботи. Так, гліцин за концентрації, яка дорівнює 0,5 %, зменшує інтенсивність забарвлення близько на 50 %. Якщо визначення проводити у присутності фосфатного буфера (0,1 моль/л), то утворюється осад.

6. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ОЦІНКА ЧИСТОТИ СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЙ ШЛЯХОМ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ

6.1. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ НЕОРГАНІЧНОГО ФОСФОРУ ЗА МЕТОДОМ ФІСКЕ–СУББАРУ

Метод базується на колориметричному визначенні кількості неорганічного фосфору, який утворюється в результаті ферментативної реакції гідролізу АТФ [33]. Фосфорна кислота здатна утворювати з молібденовою кислотою комплексну сполуку, яка легко відновлюється різними відновниками з утворенням забарвленої в синій колір молібденової сині. Утворений розчин синього кольору порівнюють зі стандартним розчином солі фосфорної кислоти, який також піддають фарбуванню. Концентрацію неорганічного фосфору в досліджуваному розчині визначають за калібрувальним графіком, який отримують з використанням стандартного розчину KH_2PO_4 .

Матеріали й реактиви

Реактив 1: 10 % аскорбінова кислота (готують безпосередньо перед дослідом); *реактив 2:* 0,42 % молібдат амонію в 1 н H_2SO_4 ; *реактив 3:* 1 мл реактиву 1 і 6 мл реактиву 2; розчин KH_2PO_4 , який містить 40 мкг/мл.

Хід роботи

Для побудови калібрувального графіка використовують розчини ортозаміщеного ортофосфату калію різної концентрації.

1. Зважують 3 мг висушеного в ексикаторі $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ і розчиняють у 100 мл дистильованої води, 1 мл такого розчину містить 30 мкг P_n .

2. У пробірки вносять розчин $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ таким чином, щоб 1 мл проби містив 5; 10; 15; 20; 25; 30 мкг. Об'єм проби доводять дистильованою водою до 0,9 мл.

3. До проб вносять 2,1 мл реактиву 3 та інкубують на водяній бані для набуття забарвлення упродовж 30 хв за температури 37°C .

4. Вимірюють величину оптичної густини за 820 нм на спектрофотометрі чи фотоелектроколориметрі проти контролю, який містить воду замість розчину $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ та реактив 3.

5. Будують калібрувальний графік залежності E_{820} від концентрації P_n , мкг/мл, приклад якого наведено на рис. 38.

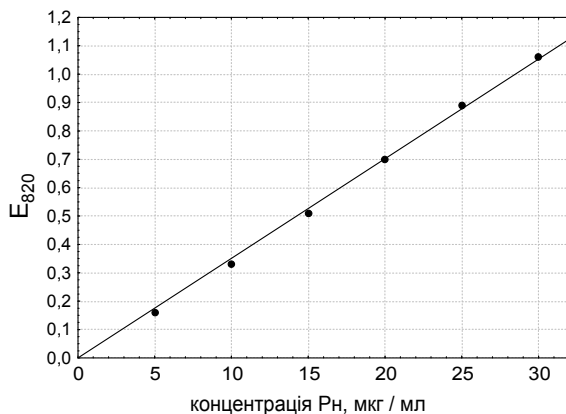


Рис. 38. Калібрувальний графік для визначення кількості неорганічного фосфору за методом Фіске-Суббароу

Для вимірювання кількості неорганічного фосфору при визначенні активності маркерних ферментів у пробірку вносять 0,9 мл реакційної суміші (джерело P_n) та 2,1 мл реактиву 3. Інкубують 30 хв за температури 37°C і визначають оптичну густину при 820 нм.

6.2. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН

6.2.1. Визначення активності Na^+, K^+ -АТФази

Na^+, K^+ -АТФаза (чутлива до оубаїну), АТФаза фосфогідролаза (КФ 3.6.1.3.), є маркерним ферментом плазматичних мембран. Проте у пла-

зматичних мембранах присутні АТФази, які не є чутливими до оуабаїну, що може створювати артефакти при визначенні цього ферменту. Визначення його активності базується на здатності серцевого глікозиду оуабаїну інгібувати Na^+ , K^+ -АТФазу [33]. Для цього визначають активність мембранного препарату в певному інкубаційному середовищі й паралельно вимірюють АТФазну активність у присутності глікозиду. Na^+ , K^+ -АТФазна активність визначається як різниця величини активності в середовищі з оуабаїном і без нього.

Матеріали й реактиви

Інкубаційне середовище: АТФ (5 ммоль/л), MgCl_2 (5 ммоль/л); NaCl (100 ммоль/л); KCl (20 ммоль/л); ЕГТА (0,25 ммоль/л); трис- HCl (50 ммоль/л, рН 7,0); оуабаїн (чи строфантин) (0,1–1 ммоль/л); 10% ТХО; білок мембранного препарату.

Хід роботи

1. У дослідні проби (три пробірки) розливають по 0,9 мл інкубаційного середовища (у контрольні по 1 мл), які містять такі реагенти: АТФ (5 ммоль/л); MgCl_2 (5 ммоль/л); NaCl (100 ммоль/л); KCl (20 ммоль/л); ЕГТА (0,25 ммоль/л); трис- HCl (50 ммоль/л, рН 7,0).

2. Паралельно розливають по 0,9 мл інкубаційного середовища, що містить оуабаїн (чи строфантин), в концентрації 0,1–1 ммоль/л.

3. Пробірки ставлять на водяну баню, створюють температуру 37 °С і, дотримуючись послідовності, додають білок: 0,1 мл з розчину з вихідною концентрацією 500–1000 мкг на 1 мл.

4. Інкубують упродовж 10 хв за 37 °С, а потім зупиняють реакцію додаванням в усі пробірки по 1 мл холодної 10 % ТХО.

5. Для осадження білка проби центрифугують упродовж 5–10 хв за 2000 об/хв.

6. Для виявлення неорганічного фосфору проводять фарбування за методом Фіске–Суббароу, як описано вище (див. розділ 2, 6.1): у пробірки відбирають по 0,9 мл надосадової рідини, додають 2,1 мл реактиву 3, інкубують 30 хв за температури 37 °С.

7. Пробі колориметрують за 680 нм проти проби, що не містить білка.

8. Розрахунок активності ферменту проводять за формулою:

$$A = \frac{\Delta E \cdot 1000 \cdot 1000}{K \cdot j \cdot 31 \cdot t} = \frac{\text{нмоль}P_n}{\text{хв} \cdot \text{мг}(\text{білка})}, \quad (1)$$

де ΔE – зміна екстинкції; 1000 – перерахунок на мг білка; K – калібрувальний коефіцієнт; 31 – молекулярна маса фосфору; j – кількість білка у пробі (50–100 мкг); 1000 – перерахунок на нмоль P_n ; t – час інкубації, хв.

Калібрувальний коефіцієнт (K) розраховують за калібрувальним графіком для визначення P_n за методом Фіске–Суббароу (див. розділ 2, 6.1):

$$K = \frac{E}{c}, \quad (2)$$

де E – екстинкція, c – концентрація P_n .

Віднімаючи із загальної АТФазної активності активність у середовищі, яке містить оуабайн, отримують значення активності маркерного ферменту – оуабайнзалежної Na^+, K^+ -АТФази.

Наприклад: ΔE_1 загальної Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТФазної активності – 0,840; ΔE_2 Mg^{2+} -АТФази (у присутності оуабайну) – 0,750; $K = 0,04$; $j = 50$ мкг; $t = 10$ хв.

$$A = \frac{[\Delta E_1 - \Delta E_2] \cdot 10^6}{0,04 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 10} = \frac{0,09 \cdot 10^6}{0,04 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 10} = 145,2 \frac{\text{нмоль}P_n}{\text{хв} \cdot \text{мг(білка)}}.$$

6.2.2. Визначення активності Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФази

Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФаза є іншими маркерним ферментом плазматичних мембран, що здійснює транспорт іонів Ca^{2+} проти градієнта їхніх концентрацій з клітини у міжклітинний простір, використовуючи енергію гідролізу АТФ. Як для прямої, так і для зворотної реакції є необхідними іони Mg^{2+} . У прямій Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФазній реакції магній бере участь у вигляді хелатного комплексу Mg^{2+} -АТР як "істинного" субстрату реакції або як ефектора, який безпосередньо зв'язується з білком.

Матеріали й реактиви

Середовище інкубації (об'єм 1 мл), яке містить трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,6); КСІ (100 ммоль/л), NaN_3 (5 ммоль/л), $CaCl_2$ (50 мкмоль/л); $MgCl_2$ (0,1 ммоль/л); ЕГТА (10 ммоль/л); Na_3VO_4 (1,4 ммоль/л); АТФ готують перед використанням (3 мг на 10 мл H_2O); 10 % ТХО; білок мембранного препарату.

Хід роботи

1. Активність як Ca^{2+} , так і Mg^{2+} -АТФази визначають у середовищі інкубації (об'єм 1 мл), який містить трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,6), КСІ (100 ммоль/л), NaN_3 (5 ммоль/л), $CaCl_2$ (50 мкмоль/л), $MgCl_2$ (0,1 ммоль/л), ЕГТА (10 ммоль/л).

2. Вносять білок мембранного препарату (50 мкг).

3. Паралельно до проб вносять Na_3VO_4 у концентрації 1,4 ммоль/л.

4. Реакцію починають, додаючи АТФ, розчин якого готують перед використанням (3 мг на 10 мл H_2O).

5. Проби інкубують упродовж 30 хв за температури 37°C.

6. Реакцію зупиняють, додаючи 1 мл 10 % ТХО.

7. Білок осаджують центрифугуванням за 3000 об/хв упродовж 10 хв.

8. У надосадовій рідині визначають вміст неорганічного фосфору за методом Фіске–Суббароу (див. розділ 2, 6.1).

9. Активність Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФази розраховують за формулою (1) як різницю між загальною АТФ-азною активністю й активністю Mg^{2+} -АТФази (швидкість гідролізу АТФ у середовищі без кальцію з додаванням Na_3VO_4 (1,4 ммоль/л)).

6.2.3. Визначення активності 5'-нуклеотидази

5'-АМФаза (5'-нуклеотидаза) – один з найбільш використовуваних маркерів для плазматичних мембран. Фермент гідролізує аденозин-5'-монофосфат з утворенням фосфорної кислоти. Активний центр ферменту розташований на зовнішній поверхні мембрани. Принцип методу полягає у визначенні кількості P_n , який утворюється у результаті гідролізу аденозин-5'-монофосфату (АМФ) [33].

Матеріали й реактиви

Інкубаційне середовище (10 мл): 7 мл трис-НСІ (0,05 ммоль/л); 2 мл $MgCl_2$ (1 ммоль/л); 1 мл АМФ (40 ммоль/л); 10 % ТХО; білок мембранного препарату.

Хід роботи

1. Готують інкубаційне середовище (10 мл), яке містить 7 мл трис-НСІ (0,05 ммоль/л); 2 мл $MgCl_2$ (1 ммоль/л); 1 мл АМФ (40 ммоль/л).
2. Інкубаційне середовище розливають у пробірки по 0,9 мл, пробірка для контролю містить 1 мл інкубаційного середовища.
3. Усі пробірки термостатують упродовж 5–10 хв за 37°C.
4. Ініціюють реакцію додаваннями білка по 0,1 мл з розчину з вихідною концентрацією 500–1000 мкг/мл.
5. Проби інкубують упродовж 15 хв за 37°C.
6. Реакцію зупиняють додаванням 1 мл холодної 10 % ТХО.
7. Осаджують білок центрифугуванням за 3000 об/хв упродовж 5 хв.
8. Визначають вміст неорганічного фосфору методом Фіске–Суббароу (див. розділ 2, 6.1).
9. Активність 5'-нуклеотидази розраховують за формулою (1) і виражають у нмолях P_n на 1 хв на 1 мг білка. Наприклад: $\Delta E_1 = 0,120$; $\Delta E_2 = 0,085$; $\Delta E_3 = 0,120$; $\Delta E_{\text{сер.}} = 0,103$; $j = 50$ мкг; $t = 15$ хв.

$$A = \frac{0,103 \cdot 1000 \cdot 1000}{0,03 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 15} = 147,7 \frac{\text{нмоль}P_n}{\text{хв} \cdot \text{мг}(\text{білка})}$$

6.2.4. Визначення активності лужної фосфатази

Лужна фосфатаза (лужна фосфогідролаза моноетерів ортофосфорної кислоти, *n*-нітрофенілфосфатаза, К.Ф. 3.1.3.1.) також належить до маркерних ферментів плазматичних мембран. Цей фермент у буферному розчині метилглюкаміну розщеплює *n*-нітрофенілфосфат на *n*-нітрофенол та ортофосфат. Активність ферменту визначають за кількістю вивільненого *n*-нітрофенолу фотометрично в лужному середовищі [33]. Ступінь інтенсивності забарвлення розчину характеризує активність ферменту. Даний фермент є характерним для везикул, які отримують з плазматичних мембран. Найбільшу активність ферменту виявлено в щітковій облямівці плазматичних мембран епітелію кишечника.

Матеріали й реактиви

Інкубаційне середовище: 0,5 моль/л метилглюкамінового буфера (рН $10,4 \pm 0,1$); *n*-нітрофенілфосфат (10 ммоль/л); $MgCl_2$ (0,1 ммоль/л); 20 % $HClO_4$; білок мембранного препарату.

Хід роботи

1. В усі пробірки розливають по 0,2 мл буфера. Додають по 0,2 мл суспензії мембран з розчину 1000 мкг/мл, а до контролю – бідистильовану воду. Переінкубують упродовж 3 хв за $37^\circ C$.

2. Ініціюють реакцію додаванням розчину субстрату по 0,05 мл. Інкубаційне середовище міститиме: метилглюкаміновий буфер (0,5 моль/л, рН $10,4 \pm 0,1$); *n*-нітрофенілфосфат (10 ммоль/л); Mg^{2+} (0,1 ммоль/л).

3. Інкубують суміш упродовж 15 хв за $37^\circ C$ у тій самій послідовності, в якій додавали субстрат, додають розчин інгібітора (комплексон III в $NaOH$ (0,7 моль/л)) по 0,2 мл.

4. Через 30 хв вимірюють оптичну густина проти проби, яка не містить білка, за 405 нм (значення екстинкції ΔE_1). В обидві кювети додають по крапліні 20 % $HClO_4$, перемішують і знову вимірюють оптичну густина (ΔE_2).

На рис. 39 наведено калібрувальний графік для визначення активності лужної фосфатази. Активність ферменту виражають у наномолях *n*-нітрофенолу, який вивільнився за 1 хв на 1 мг білка. Розрахунок активності ферменту виконують за калібрувальним графіком (рис. 39) за різницею оптичної густини $\Delta E_1 - \Delta E_2$.

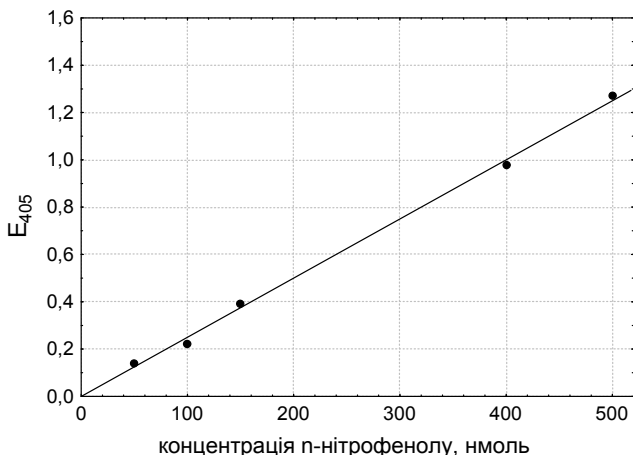


Рис. 39. Калібрувальний графік для визначення активності лужної фосфатази [33]

6.3. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ МІКРОСОМ

6.3.1. Визначення активності глюкозо-6-фосфатази

До маркерних ферментів плазматичної мембрани належать глюкозо-6-фосфатаза, а також ціла низка ферментів перенесення електронів. Глюкозо-6-фосфатаза гідролізує глюкозо-6-фосфат з утворенням глюкози та неорганічного фосфату. Метод визначення активності ферменту заснований на реєстрації кількості неорганічного фосфату, який звільнюється в результаті перебігу реакції [33].

Матеріали й реактиви

Інкубаційна суміш: гістидин (17,5 ммоль/л), глюкозо-6-фосфат (20 ммоль/л), ЕДТА (1 ммоль/л); 8 % ТХО; білок мембранного препарату.

Хід роботи

1. Готують інкубаційну суміш (0,45 мл), яка містить: гістидин (17,5 ммоль/л), глюкозо-6-фосфат (20 ммоль/л), ЕДТА (1 ммоль/л). Об'єм інкубаційної суміші для кожної проби становить 0,45 мл.

2. Реакцію починають додаванням в усі проби (крім контролю) по 0,05 мл білка в діапазоні концентрації 500–1000 мкг/мл, щоб його вміст у пробі становив 25–30 мкг.

3. Проби та контроль інкубують за 37°C упродовж 15 хв. Реакцію зупиняють додаванням 2,5 мл 8 % ТХО.

4. Визначають кількість неорганічного фосфату за методом Фіске–Суббароу: у пробірки додають 2,1 мл реактиву 3, який містить 1 мл реактиву 1 і 6 мл реактиву 2.

5. Проби центрифугують упродовж 10 хв за 2000 об/хв для осадження білка, а потім вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 820 нм проти проби, яка не містить білка. Від моменту додавання молібдату до моменту колориметрування має пройти 30 хв.

6. Розрахунок активності ферменту проводять за формулою:

$$A = \frac{2 \cdot \Delta E \cdot 1000 \cdot 1000}{K \cdot j \cdot 31 \cdot t} = \frac{\text{нмольР}_n}{\text{хв} \cdot \text{мг(білка)}},$$

де ΔE – значення екстинкції; j – концентрація білка, мкг; t – час інкубації, хв; K – калібрувальний коефіцієнт, розрахований за калібрувальним графіком (див. рис. 38); 2 – перерахунок на 1 мл; 31 – молекулярна маса фосфору; 1000 – перерахунок на міліграм білка; 1000 – перерахунок на 1 нмоль.

Наприклад, $K = 0,04$; $t = 15$ хв; $j = 50$ мкг; $\Delta E_{\text{сер.}} = 0,610$.

$$A = \frac{2 \cdot 0,610 \cdot 1000 \cdot 1000}{0,04 \cdot 31 \cdot 50 \cdot 15} = 83,2 \frac{\text{нмольР}_n}{\text{хв} \cdot \text{мг(білка)}}.$$

6.3.2. Визначення активності НАД·Н-дегідрогенази

НАД·Н-дегідрогеназа належить до ферментів ланцюга перенесення електронів і в невеликих кількостях міститься в мембранах ЕПР, а також у внутрішніх мембранах мітохондрій. Цей фермент переносить електрони від НАД·Н до акцептора (можливо, одного з білків дихального ланцюга, який містить негемінове залізо).

Метод базується на визначенні зменшення концентрації НАД·Н (за зміною оптичної густини за 340 нм, характерної для відновленого НАД·Н) [33].

Матеріали й реактиви

Розчин: 0,1 мл трис-НСІ буфера (0,5 моль/л), 0,2 мл $K_3Fe(CN)_6$ (10^{-5} моль/л), 0,2 мл НАД·Н (1,5 ммоль/л) (31,5 мг в 3 мл буфера), бідистильовану воду до 3 мл; білок мембранного препарату.

Хід роботи

1. У пробірку для контролю, за якою встановлюють щілину у спектрофотометрі, наливають такі розчини: 0,1 мл трис-НСІ буфера; 0,2 мл $K_3Fe(CN)_6$, 0,2 мл НАД·Н; бідистильовану воду до 3 мл.

2. У пробірку для визначення активності ферменту додають білок (0,1 мл з розчину, який містить 500–1000 мкг/мл) і рееструють зменшення (окиснення) НАД·Н через 1, 6, 11 хв після додавання білка. Об'єм інкубаційної суміші становить 2,9 мл.

Розрахунок проводять таким чином:

Відомо, що значення екстинкції 0,027 відповідає $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л окисненого НАД. Активність НАД·Н-дегідрогенази дорівнюватиме:

$$A = \frac{x \cdot 60 \cdot 1000}{j \cdot t} = \frac{\text{нмоль(НАД·Н)}}{\text{мг(білка) \cdot год}}, \quad (2)$$
$$x = \frac{1 \cdot 10^{-7} \cdot E_{340}}{0,207},$$

де x – кількість утвореного НАД; 60 – перерахунок на 1 мг; t – час вимірювання, хв; j – кількість внесеного білка; ΔE_{340} – зміна оптичної густини.

Наприклад: $t = 6$ хв, $j = 50$ мкг, $\Delta E_{340} = 0,200$.

$$A = \frac{1 \cdot 10^{-7} \cdot 0,200 \cdot 60 \cdot 1000}{0,207 \cdot 6 \cdot 50} \approx 20 \frac{\text{нмоль(НАД·Н)}}{\text{мг(білка) \cdot год}}.$$

6.3.3. Визначення активності Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулула

Ca^{2+} -АТФаза здійснює гідроліз АТФ при активному транспорті іонів Ca^{2+} у цистерни саркоплазматичного ретикулула. Метод базується на

визначенні неорганічного фосфату, який звільняється при гідролізі АТФ під дією ферменту [33].

Матеріали й реактиви

Інкубаційна суміш: імідазол (5 ммоль/л), КСl (100 ммоль/л), MgCl₂ (3,5 ммоль/л), азид Na (5 ммоль/л), ЕДТА (3 ммоль/л), оксалат натрію (2 ммоль/л), АТФ (3 ммоль/л), Н₂О; 1,5 % холодна ТХО; 2,5 % молібдат амонію на 5 н; Н₂SO₄; 2 % аскорбінова кислота, 1 мл Н₂О.

Хід роботи

1. Готують інкубаційну суміш (1,9 мл) таким чином, щоб концентрація реагентів відповідала: імідазолу – 50 ммоль/л, КСl – 100 ммоль/л, MgCl₂ – 3,5 ммоль/л, азиду Na – 5 ммоль/л, ЕДТА – 3 ммоль/л, оксалат натрію – 2 ммоль/л, АТФ – 3 ммоль/л, Н₂О.

Для цього беруть 0,1 мл імідазолу (1 моль/л), 0,2 мл КСl (1 моль/л), 0,1 мл MgCl₂ (30 ммоль/л), 0,1 мл азиду Na (1000 ммоль/л), 0,2 мл ЕДТА (30 ммоль/л), 0,2 мл оксалату натрію (20 ммоль/л), 0,2 мл АТФ (30 ммоль/л) і доводять водою до 1,9 мл (у дослідній пробі) і до 2 мл (у контрольній пробі).

2. Пробірки поміщають на баню та після досягнення температури 37 °С починають реакцію додаванням в усі пробірки 0,1 мл 1,5 %ї холодної ТХО у тій самій послідовності, в якій додається білок.

3. Визначають неорганічний фосфор, додаючи в усі пробірки: 1 мл 2,5 % молібдату амонію на 5 н Н₂SO₄, 1 мл 2 %аскорбінової кислоти, 1 мл Н₂О.

4. Пробірки центрифугують упродовж 10 хв за 2000 об/хв для осадження білка, а потім колориметрують проти проби, яка не містить білка, за довжини хвилі 680 нм. Колориметрують не пізніше як 30 хв після додання молібдату амонію.

Розрахунок активності проводять за формулою (1).

Наприклад: $\Delta E = 0,620$; $K = 0,040$; $t = 30$ хв; $j = 50$ мкг.

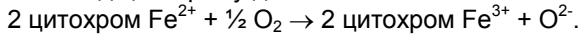
$$A = \frac{0,620 \cdot 1000 \cdot 1000}{2 \cdot 0,04 \cdot 31 \cdot 30 \cdot 50} = 166,6 \frac{\text{нмоль}(P_H)}{\text{хв} \cdot \text{мг}(\text{білка})}$$

6.4. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ МІТОХОНДРІЙ

6.4.1. Визначення активності цитохромоксидази

Визначення забруднення різних фракцій мембран мітохондріями є можливим з достатнім ступенем точності, тоді як мітохондрії різних тканин мають одні й ті самі маркерні ферменти. Цитохромоксидаза (К.Ф. 1.9.3.1) – фермент, який розташований на внутрішній мембрані мі-

тохондрій і який бере участь у перенесенні електронів у процесі окисного фосфорилування від цитохрому до кисню.



Для виявлення цитохромоксидази використовується реакція окиснення деяких амінів і фенолів киснем (рис. 40) [33].

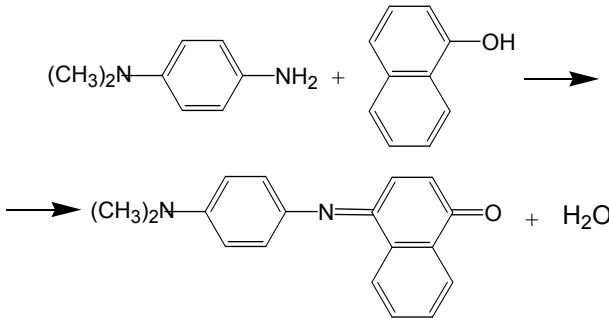


Рис. 40. Окислення α -нафтолу та N,N-диметилпарафенілдіаміну [33]

Найпоширеніший метод – окиснення α -нафтолу та N,N-диметилпарафенілдіаміну (реактив Наді) з утворенням індофенолового блакитного. Утворений пігмент екстрагують абсолютним спиртом.

Перший метод

Матеріали й реактиви

розчин субстрату: α -нафтол : парафенілдіамін : карбонату натрію (1 : 1 : 1).

Хід роботи

1. Готують розчин субстрату, змішуючи рівні об'єми розчинів α -нафтолу, парафенілдіаміну й карбонату натрію у співвідношенні 1 : 1 : 1. У пробірки розливають по 1 мл субстрату реакції, а потім – по 0,1 мл суспензії мембранної фракції (у контроль – 0,1 мл H_2O).

2. Інкують за 37°C упродовж 30–60 хв і додають у кожен пробірку по 3 мл спирту. Проби центрифугують за 6000 об/хв протягом 10 хв.

3. Надосадову рідину спектрофотометрують за довжини хвилі 550 нм. Активність ферменту вираховують, виходячи з того, що зниження оптичної густини на одиницю еквівалентно відновленню 0,44 одиниці кисню.

Результати виражають в одиницях цитохромоксидазної активності:

$A = \Delta E \cdot 0,44 = E$ цитохромоксидазної активності (EO_2). Порівнюють активність цитохромоксидази ПМ з активністю її в мітохондріальній фракції.

Другий метод

Другий метод є модифікацією наведеного вище методу визначення цитохромоксидазної активності. Принцип методу полягає в окисненні

N,N-диметилпарафенілдіаміну ферментом, в результаті чого утворюється пігмент з максимумом поглинання $\lambda = 510$ нм, у кількості, пропорційній цитохромоксидазній активності. Утворений пігмент екстрагують сумішшю абсолютного етилового спирту з тетрахлоретиленом. У ході ферментативної реакції відновлений стан цитохрому с підтримується диметилпарафенілдіаміном (ДФДА).

Матеріали й реактиви

Екстрагуюча суміш: спирт і тетрахлоретилен (3 : 1); 0,04 % водний розчин цитохрому с; 0,4 % розчин ДФДА; суміші спирт і тетрахлоретилен (1 : 1); сірчана кислота.

Хід роботи

Розчини цитохрому с і диметилпарафенілдіаміну готують у день досліду й поміщають на баню з кригою. Екстрагуючу суміш готують, змішуючи спирт і тетрахлоретилен у співвідношенні 3 : 1.

1. У пробірки поміщають по 0,2 мл 0,04 % водного розчину цитохрому с, по 0,2 мл суспензії мембран у фосфатному буфері, доводять водою до 1 мл і витримують за 37 °С упродовж 5 хв. Реакції ініціюють додаванням в усі проби, крім контролю, по 0,1 мл 0,4 % розчину ДФДА.

2. Інкують проби протягом 1–5 хв до появи червоного забарвлення.

3. Після закінчення інкубації всі проби поміщають на лід та екстрагують пігмент чотирикратним об'ємом суміші спирту й тетрахлоретилену. Цими розчинниками пігмент видаляється повністю за слабкокислої реакції середовища (рН 5,6–6,0), яка створюється у пробі після внесення в неї диметилпарафенілдіаміну гідрохлориду. У разі необхідності можна довести рН у пробі до 5,6–6,0 розведеною сірчаною кислотою.

4. Пробірки центрифугують за 6000 об/хв. Надосадову рідину спектрофотометрують за довжини хвилі 510 нм проти екстрагуючої суміші. Забарвлення залишається стійким упродовж 10 хв.

Активність цитохромоксидази виражають у наномолях ДФДА, окисненого за 1 хв на 1 мг білка. Розрахунок активності проводять за калібрувальним графіком, який будується аналогічно наведеним раніше.

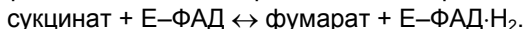
Для побудови калібрувального графіка використовують біхромат калію, у присутності якого ДФДА неферментативно окиснюється з утворенням червоного пігменту. Встановлюють кілька рядів пробірок і розливають 0,02 % розчин біхромату калію від 0,1 до 0,9 мл, потім доливають:

у перший ряд	0,15 мл	0,01 % розчину ДФДА
у другий ряд	0,20 мл	— " —
у третій ряд	0,25 мл	— " —
у четвертий ряд	0,30 мл	— " —

Додають фосфатний буфер так, щоб об'єм інкубаційної суміші становив 1,5 мл. Потім здійснюють екстракцію таким самим чином, як і в досліді. Через 3–5 хв вимірюють оптичну густину за 510 нм.

6.4.2. Визначення активності сукцинатдегідрогенази

Сукцинатдегідрогеназа (К.Ф. 1.3.99.1) міцно зв'язана з внутрішньою мітохондріальною мембраною й являє собою флавопротеїд, у молекулі якого як кофермент ковалентно зв'язаний флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Цей кофермент діє як акцептор водню в такій реакції:



Перший метод

Один з методів визначення сукцинатдегідрогеназної активності базується на вимірюванні оптичної густини (за $\lambda = 600$ нм) 2,6-дихлорфеноліндофенолу (ДХФІФ), який відновлюється у присутності феназинметасульфату (ФМС) при ферментативному окисненні сукцинату (рис. 41) [33].

Матеріали й реактиви

Інкубаційне середовище: фосфатний буфер (10 ммоль/л, рН 7,4), розчин сукцинату натрію (10 ммоль/л), розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,05 ммоль/л), 0,1–0,2 мл білка; феназинметасульфат (1,8 ммоль/л).

Хід роботи

1. У пробірки (кінцевий об'єм 4 мл) вносять певні об'єми розчинів буфера, ЕДТА, сукцинату натрію, ціаніду калію або азиду натрію, ДХФІФ, 0,1 – 0,2 мг білка в 0,1–0,2 мл і перемішують. Не слід завчасно змішувати розчини сукцинату, феназинметасульфату і ДХФІФ, оскільки може відбутися неферментативне відновлення останнього. Інкубаційне середовище має містити такі компоненти: фосфатного буфера (10 ммоль/л, рН 7,4); розчин сукцинату натрію (10 ммоль/л); розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,05 ммоль/л); 0,1–0,2 мл білка (рекомендується до розчину білка додати тритон X-100 до концентрації 1 % для руйнування мітохондрій і доступності субстрату для ферменту).

2. Суміш перемішують, переливають у кювету та вимірюють оптичну густину за 600 нм. Потім додають феназинметасульфат до його концентрації 1,8 ммоль/л і вимірюють оптичну густину через кожні 2 хв проти середовища без ФМС і без 2,6-ДХФІФ. Аналогічним чином вимірюють оптичну густину пробах із середовищем, що не містить сукцинату.

При розрахунку істинної активності величини ендогенної активності віднімають від величин, які виражають активність сукцинатдегідрогенази у пробах, які містять сукцинат ($\Delta E = \Delta E_{\text{заг.}} - \Delta E_{\text{ендог.}}$).

Для розрахунку активності сукцинатдегідрогенази використовують величину зниження оптичної густини (у ході ферментативної реакції) за 1 хв на 1 мг білка. Активність виражають у наномолях окисненого сукцинату, враховуючи, що зниження оптичної густини на одиницю еквівален-

тно відновленню 60 нмоль 2,6-ДХФІФ, а кількість відновленого барвника пропорційна кількості окисненого сукцинату.

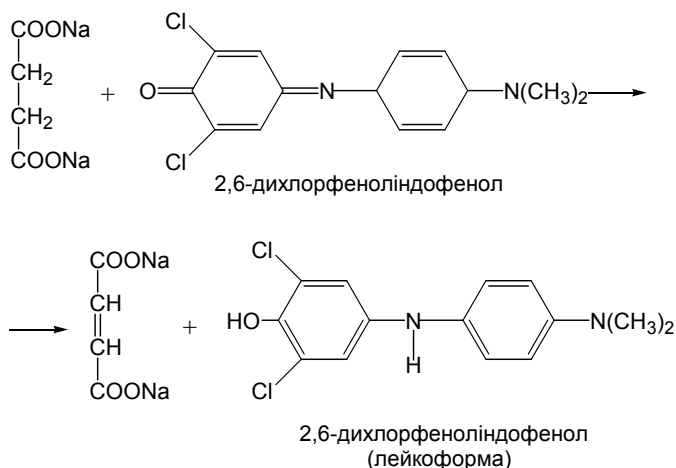


Рис. 41. Відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу [33]

Другий метод

Активність сукцинатдегідрогенази можна визначити за відновленням цитохрому с. Метод базується на зміні екстинкції при відновленні цитохрому с. Хід процесу показано на схемі (рис. 42).

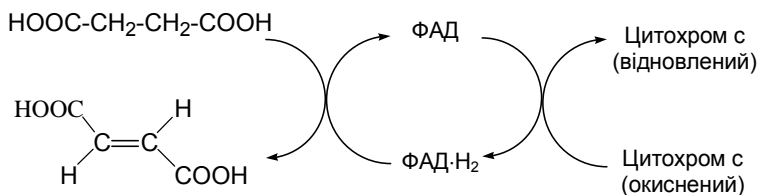


Рис. 42. Відновлення цитохрому с

Оскільки цитохромоксидаза розташована на внутрішній мембрані мітохондрій і є недоступною для субстрату – ендогенного цитохрому с, досліджувану фракцію мембран слід обробляти різними засобами: гіпотонічний шок, заморожування та відтаювання, 10–15-хвилинний преінкубація в розчині детергента (1 % дезоксихолату натрію, 0,1 % тритоні Х-100).

Матеріали й реактиви

сукцинат натрію (0,5 моль/л); AlCl_3 (4 ммоль/л) і CaCl_2 (4 ммоль/л); розчин цитохрому с ($4,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л на фосфатному буфері (40 ммоль/л)).

Хід роботи

1. У кювету поміщують 100–200 мкг в 0,1 мл білка й додають 0,1 мл сукцинату натрію (0,5 моль/л). Суміш ретельно перемішують та інкубують упродовж 2–3 хв за кімнатної температури. До суміші додають 0,1 мл розчину азиду натрію, а через 1 хв – 0,3 мл суміші AlCl_3 (4 ммоль/л) і CaCl_2 (4 ммоль/л) і відразу ж – 2,5 мл розчину цитохрому с.

2. Зміна екстинкції, яка відбувається при відновленні цитохрому с, реєструється на спектрофотометрі за 550 нм через кожні 15 с упродовж 3 хв. У кінці визначення до проби додають гідросульфат натрію до повного відновлення цитохрому с, про що свідчить припинення збільшення оптичної густини. У контролі присутні всі компоненти, крім білка.

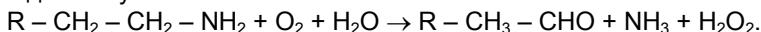
Різниця оптичної густини до й після ферментативного відновлення цитохрому с (ΔE), віднесена до 1 мг білка, є мірою цитохром с-сукцинатдегідрогеназної активності.

$$A = \frac{(\Delta E_{\text{заг.}} - \Delta E_{\text{ендог.}}) \cdot 1000}{3j} = \frac{\Delta E_{550}}{\text{хв Чмг(білка)}},$$

де j – кількість внесеного білка, мкг; 1000 – перерахунок на 1 мг; 3 – час реєстрації оптичної густини, хв; ΔE_{550} – різниця оптичної густини до й після ферментативного відновлення цитохрому с.

6.4.3. Визначення активності моноамінооксидази

Моноамінооксидаза мітохондрій (К.Ф. 1.4.3.4) каталізує реакцію окисного дезамінування:



Даний метод базується на вимірюванні кількості утвореного альдегіду при ферментативному дезамінуванні *n*-нітрофенілетиламіну [33]. Утворений забарвлений продукт жовтогогарячого кольору з максимумом поглинання $\lambda = 450$ нм у сильнолужному середовищі екстрагують *n*-бутанолом. Вказаний забарвлений пігмент являє собою продукт конденсації *n*-нітрофенілацетальдегіду (продукту окисного дезамінування *n*-нітрофенілетиламіну) з надлишком цього аміну.

За збільшенням оптичної густини за довжини хвилі 450 нм визначають ферментативну активність моноамінооксидази. Метод характеризується високою чутливістю й може бути легко відтвореним.

Матеріали й реактиви

Аосфатний буфер (10 ммоль/л): Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , рН 7,4; розчин *n*-нітрофенілетиламіну (50 ммоль/л); 0,5 % розчин NaOH ; *n*-бутанол.

Хід роботи

1. У пробірки (одне визначення потребує три пробірки) вносять по 1 мл досліджуваного матеріалу (фракція мембран), додають 1 мл фосфатно-

го буфера (0,2 моль/л), 0,1 мл розчину *n*-нітрофенілетиламіну (50 ммоль/л) й води до об'єму 3 мл. У контрольну пробірку замість досліджуваного матеріалу доливають воду.

2. Проби ретельно перемішують і поміщають у термостат за 37 °С на 45 хв. Відразу ж після інкубації реакцію дезамінування *n*-нітрофенілетиламіну інактивують додаванням до проб 0,5 % розчину їдкого натру до рН 10,0; рН контролюють за зміною кольору індикаторного паперу. Потім у пробірки вносять по 4 мл *n*-бутанолу, зачинають їх притертими пробками й сильно збовтують протягом 1 хв.

3. Вміст пробірок переносять у поліетиленові центрифужні пробірки й центрифугують упродовж 5 хв за 4000 г. Верхню бутанолову фазу обережно переносять у кювету й вимірюють оптичну густину зразка проти бутанолової фази, отриманої в результаті аналогічної обробці контрольної проби.

Чим більшою є моноамінооксидазна активність досліджуваного матеріалу, тим вищі вимірювані величини оптичної густини. Активність моноамінооксидази виражають у наномолях вивільненого аміаку на 1 мг білка за 1 хв. Для розрахунку рекомендується використовувати калібрувальний графік для переведення величини оптичної густини бутанолового екстракту в мікромолі аміаку, що вивільнюється при реакції окисного дезамінування *n*-нітрофенілетиламіну. Графік побудовано на базі порівняннн вимірювання моноамінооксидазної активності, що описано вище (рис. 43).

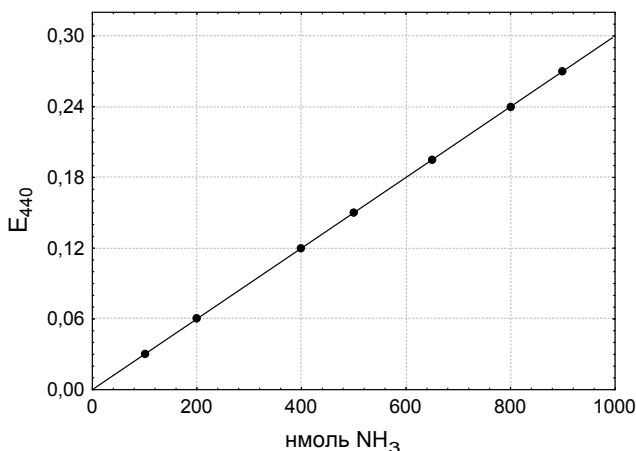


Рис. 43. Залежність між кількістю аміаку, вивільненого при дезамінуванні *n*-нітрофенілетиламіну мітохондріями печінки щура, й оптичної густиною бутанолового екстракту паралельних проб [33] (На осі ординат – оптична густина за 440 нм; на осі абсцис – кількість аміаку у пробі в наномолях.)

Для розрахунку моноамінооксидазної активності з точки на осі ординат, яка відповідає оптичній густині досліджуваного зразка, проводять пряму, паралельну осі абсцис, до перетину з калібрувальною кривою. З точки перетину цих двох ліній проводять пряму до осі абсцис. Значення, отримане на осі абсцис, використовують для перерахунку моноамінооксидазної активності досліджуваного зразка в одиницях $\frac{\text{нмоль}(\text{NH}_3)}{\text{хв} \cdot \text{мг}(\text{білка})}$.

7. ВИДІЛЕННЯ МЕМБРАННИХ ПРЕПАРАТІВ ТРАНСПОРТНИХ АТФАЗ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ

7.1. ОТРИМАННЯ МЕМБРАННИХ ПРЕПАРАТІВ

Na⁺,K⁺-АТФази ІЗ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ КРОЛЯ

Na⁺,K⁺-АТФазу у складі скелетних м'язів кроля та жаби було виявлено у 1962 р. Водночас було запропоновано метод виділення сарколеми, який базувався на екстракції внутрішнього вмісту зруйнованих м'язових клітин розчинами високої іонної сили. Пізніше оубаїнчутливі АТФази було виділено з мембранних фракцій скелетних м'язів за допомогою центрифугування за 30 000 г упродовж 1 год. Найбільш очищений препарат Na⁺,K⁺-АТФази отримано із сарколеми м'язів жаби із застосуванням на останній стадії очищення рівноважного центрифугування у градієнті густини сахарози; активність ферменту становила 96 мкмоль P_i/мг білка за 1 год.

Запропонований метод виділення препаратів сарколеми дозволяє отримати препарати з високою активністю Na⁺,K⁺-АТФази за задовільного виходу білка [39].

Матеріали й реактиви

Середовище гомогенізування: сахароза (0,25 моль/л), трис (10 ммоль/л), ЕДТА (0,5 моль/л, рН 7,5–7,6); трис-НСІ (20 ммоль/л, рН 7,8–8,0); LiBr (1 моль/л); розчин КСІ (0,6 моль/л) і трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,8–8,0); гістидин (5 ммоль/л); середовища зберігання: 0,1–, 2 % альбумін, сахароза (0,25 моль/л), гістидин (10 ммоль/л, рН 7,2–7,4); LiBr (0,5 моль/л).

Хід роботи

1. Схему виділення наведено на рис. 44. Кролів декапітують, видаляють м'язи гомілки або стегна, очищують від сухожилок і жирової тканини, подрібнюють і поміщають у блендер Уоринга в 10-кратний об'єм середовища гомогенізування: сахароза (0,25 моль/л), трис (10 ммоль/л), ЕДТА (0,5 моль/л, рН 7,5–7,6). Суспензію гомогенізують упродовж 2–3 хв за 8000 об/хв.

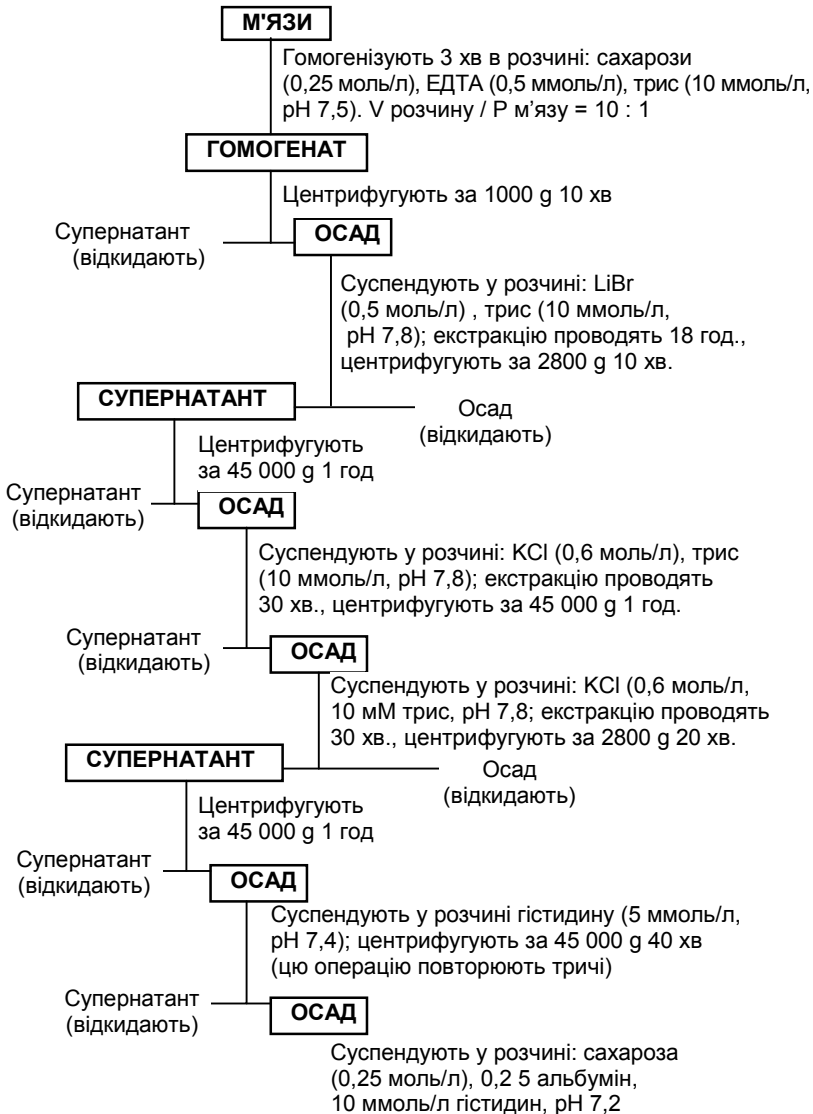


Рис. 44. Схема виділення сарколеми [39]

2. Гомогенат фільтрують крізь два шари марлі й центрифугують упродовж 10 хв за 2800 г. Осад двічі відмивають у середовищі гомогенізації й суспендують у чотири–пятикратному (в/о) об'ємі трис-НСІ

(20 ммоль/л, рН 7,8–8,0). Потім при постійному перемішуванні до суспензії доливають рівний об'єм LiBr (1 моль/л).

Екстракцію проводять при постійному перемішуванні упродовж 15–18 год.

3. Суспензію центрифугують за 2800 г упродовж 10 хв, осад відкидають, а супернатант центрифугують за 40 000–45 000 г протягом 1 год. Осад суспендують у п'ятикратному (в/о) об'ємі розчину KClO (6 моль/л), трис-HCl (10 ммоль/л, рН 7,8–8,0). Екстракцію проводять протягом 15–30 хв при перемішуванні, після чого центрифугують за 40 000–45 000 г упродовж 1 год й осад знову суспендують у KCl (0,6 моль/л).

4. Через 15 хв суспензію фільтрують крізь два шари марлі й відкидають фракцію 2800 г упродовж 20 хв, а супернатант центрифугують за 40 000 – 45 000 г упродовж 1 год. Осад суспендують у розчині гістидину (5 ммоль/л, рН 7,5) і центрифугують за 40 000–45 000 г упродовж 30–40 хв. Останню операцію повторюють двічі.

5. Відмитий осад суспендують у 2–5 мл середовища зберігання (0,1–0,2 % альбумін, сахароза (0,25 моль/л), гістидин (10 ммоль/л, рН 7,2–7,4) і зберігають за 2–4 °С.

Усі операції проводять за 0–4 °С. Осади ресуспендують у скляному гомогенізаторі Поттера з тефлоновим товкачем.

Відтворюваність цього методу суттєво залежить від в'язкості суспензії, отриманої після 15–18-годинної екстракції в LiBr (0,5 моль/л). Якщо в'язкість суспензії є занадто високою, проводять більш тривале центрифугування. Після центрифугування суспензії з низькою в'язкістю утворюється густий осад, який важко підлягає суспендуванню.

Осад, який відкидають після центрифугування за 2800 г на двох етапах виділення, містить основну кількість Na^+ , K^+ -АТФази, проте активність ферменту в даному випадку є нелінійною в часі.

АТФазна активність препаратів на 30–60 % пригнічується оуабаїном (1 ммоль/л), на 20–30 % – ЕГТА (0,1 ммоль/л) і лише на 5–7 % – NaN_3 (10 ммоль/л). Оуабаїн інгібує АТФазу до рівня активності в середовищі без Na^+ і K^+ .

Максимальну активність Na^+ , K^+ -АТФаза має в середовищі, яке містить NaCl (80 ммоль/л) та KCl (60 ммоль/л) за рН 7,2–7,4 (25–35 мкмоль P_i /мг білка за годину).

7.2. ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ Na^+ , K^+ -АТФАЗИ З НИРОК МОРСЬКОЇ СВИНКИ [39]

Матеріали й реактиви

Розчин NaCl (0,15 моль/л) для перфузії нирки; розчин 1 мг/мл гепарину у NaCl (0,15 моль/л); розчин для гомогенізації 1 (35 мл): сахароза (250 ммоль/л), NaCl (20 ммоль/л), ЕДТА- Na_2 (5 ммоль/л), MgCl_2 (1 ммоль/л) і імідазол (10 ммоль/л, рН 7,0); розчин для гомогенізації 2: сахароза (250 ммоль/л), ЕДТА- Na_2 (2 ммоль/л), MgCl_2 (0,1 ммоль/л), імі-

дазол (4 ммоль/л), який містить 0,02 % гепарин; розчин NaCl (10 ммоль/л), який містить ЕДТА-Na₂ (0,75 моль/л) і імідазолу (4 ммоль/л); розчин, який містить імідазол (12 ммоль/л), ЕДТА (0,1 ммоль/л) і 0,005 н HCl.

Хід роботи

1. Нирки морської свинки після попередньої перфузії розчином NaCl (0,15 моль/л) за 20 °С видаляють з організму й поміщають у лід. Усі наступні процедури проводять за 3–6 °С. За 10 хв до перфузії тваринам вводять гепарин з розрахунку 1 мг на 200 г маси тварини (розчин 1 мг/мл у NaCl (10,15 моль/л)) для запобігання згортанню крові під час перфузії.

2. Охолоджену нирку розрізають навпіл, мозкову частину видаляють, нирку подрібнюють, пропускаючи крізь сітку з діаметром пор 1 мм. Отриману пасту розділяють на порції по 2–2,5 г і гомогенізують за допомогою механічного гомогенізатора з тефлоновим товчачем у 35 мл розчину 1: сахароза (250 ммоль/л), яка містить NaCl (20 ммоль/л), ЕДТА-Na₂ (5 ммоль/л), MgCl₂ (1 ммоль/л) і імідазол (10 ммоль/л). Цей, а також всі наступні розчини повинні мати рН 7,0 й бути приготованими на деіонізованій воді.

3. Гомогенат центрифугують за 300 г упродовж 10 хв. Отриману надосадову рідину центрифугують протягом 1 год за 22 000 г, утворений осад використовують для подальшої препаративної роботи.

Основним ускладненням при виділенні Na⁺,K⁺-АТФази є очищення отриманого препарату від АТФази, що не залежить від Na⁺ і K⁺, яка у великій кількості міститься в мітохондріях. Для видалення Mg²⁺-АТФази використовують різні додаткові процедури. Так, за допомогою обробки детергентами (дезоксихолатом) було отримано з нирок теляти препарат, 99 % АТФазної активності якого були залежними від Na⁺ і K⁺. Проте при застосуванні такого підходу було втрачено 50 % активності Na⁺,K⁺-залежної АТФази. При цьому зросла частка Na⁺,K⁺-АТФази при зберіганні препарату за 2 °С. Цей процес можна прискорити додаванням сечовини.

4. Присутність гепарину в середовищі приводить до відокремлення мітохондрій. Оскільки нечутлива до Na⁺ і K⁺ АТФаза переважно зв'язана з мембранами мітохондрій, у запропонованій схемі виділення Na⁺,K⁺-АТФази на наступному етапі роботи отриманий осад (див. п. 3) гомогенізують у розчині 2: сахароза (250 ммоль/л), ЕДТА-Na₂ (2 ммоль/л), MgCl₂ (0,1 ммоль/л), імідазол (4 ммоль/л), який містить 0,02 % гепарин, і знову центрифугують за 22 000 г упродовж 1 год.

5. За такої обробки отримують двошаровий осад: нижній, темний шар являє собою мітохондрії та їх уламки; верхній, світлий – уламки мембран. Тому надосадову рідину обережно декантують, потім змивають цей шар і гомогенізують у розчині NaCl (10 ммоль/л), що містить ЕДТА-Na₂ (0,75 моль/л) та імідазол (4 ммоль/л), і центрифугують упродовж 30 хв за 22 000 г.

6. Отриманий осад гомогенізують у невеликому об'ємі (10–15 мл) розчину, який містить імідазол (12 ммоль/л), ЕДТА (0,1 ммоль/л) і 0,005 н HCl.

Отриманий гомогенат можна використовувати в дослідях. Для видалення залишкового Na^+ його можна ще раз промити вищевказаним розчином.

Частка чутливої Na^+ і K^+ -АТФазної активності у препаратах, отриманих за допомогою гепарину, коливається від 85 до 90 % і суттєво не змінюється при їх зберіганні упродовж п'яти тижнів за 2°C , а також у результаті обробки сечовиною (2 моль/л). Усі розчини, що використовуються в ході виділення, повинні містити невелику кількість ЕДТА, який є необхідним для зв'язування іонів Ca^{2+} , які інактивують Na^+ , K^+ -АТФазу.

АТФазну активність отриманого препарату визначають за кількістю P_i , який відщеплюється від АТФ за 2 год і за оптимальних умов.

Властивості отриманого препарату. Наведена процедура дозволяє отримати препарат з активністю Na^+ , K^+ -АТФази приблизно 100 мкмоль P_i /мг білка за годину, що становить 80–95 % його загальної АТФазної активності. В умовах зберігання за $3\text{--}6^\circ\text{C}$ вихідна активність залишається незмінною протягом двох–трьох місяців. Домішки Ca^{2+} повільно інактивують фермент, тому середовище зберігання має містити ЕДТА. За будь-яких концентрацій Na^+ і K^+ оубаїн (10^{-5} моль/л) повністю пригнічує Na^+ , K^+ -АТФазну активність. У разі необхідності можна підвищити активність отриманого препарату за допомогою обробки детергентами.

7.3. ОТРИМАННЯ СТАБІЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ Na^+ , K^+ -АТФАЗИ З МОЗКУ БИКА

З усіх найбільш відомих джерел Na^+ , K^+ -АТФази (нирки, мозок та еритроцити ссавців, електричний орган і сольові залози риб) мозок з багатьох причин використовується найчастіше. Мозкова речовина є доступною, добре підлягає препаруванню, її легко зберігати, вона характеризується достатньо високою вихідною активністю ферменту. Даний метод розроблено для отримання великих кількостей стабільного препарату Na^+ , K^+ -АТФази, майже повністю позбавленого Mg -залежної активності [39]. Кінцевий препарат характеризується виходом приблизно 60–65 % ферменту із чистотою близько 3 %; активність залишається незмінною упродовж чотирьох місяців зберігання ферменту за -20°C .

Матеріали й реактиви

0,25 % розчин дезоксихолату натрію (ДОХ); NaSCN ; розчин 1: сахароза (0,25 моль/л), гістидин (30 ммоль/л), рН 7,2 за 37°C ; розчин 2: сахароза (0,25 моль/л), гістидин (30 ммоль/л), ЕДТА (5 ммоль/л), доведений до рН 7,2 за 37°C за допомогою 2-аміно-, 2-метил-, 1,3-пропандіолу).

Хід роботи

Схему досліду наведено на рис. 45 та проілюстровано в табл. 13, де вказано сумарну активність Na^+ , K^+ -АТФази й Mg^{2+} -АТФази.

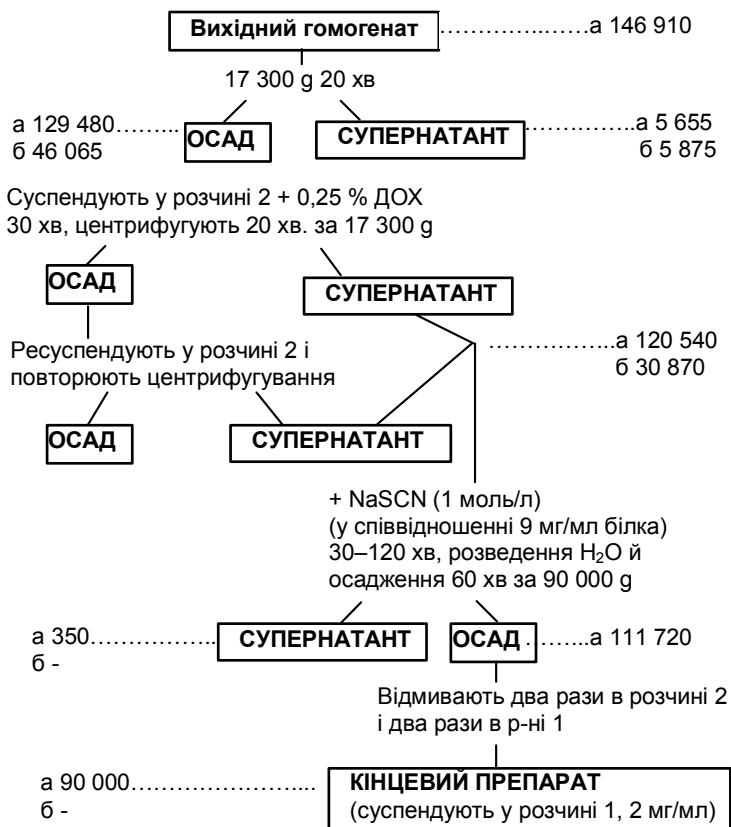


Рис. 45. Схема виділення препарату Na^+, K^+ -АТФази з мозку бика [39]:
 а і б – загальні активності Na^+, K^+ -АТФази і Mg^{2+} -АТФази (мкмоль P_n /год)

Підготовка мозкової речовини. Мозок биків (телят) після забою тварин привозять до лабораторії в охолоджену розчині 1. Після видалення плівок сіру речовину зшкрібують і розподіляють у стакани по 50 г, додаючи мінімальну кількість розчину 1. Зберігають (за необхідності) за температури від -20°C до -60°C .

Препаративна робота. Усі операції, крім означених окремо, виконують за температури льодяної бані, але кімнатна температура на всіх етапах, крім центрифугування й суспендування (гомогенізації), не впливає на кінцевий результат.

1. 50 г свіжорозмороженої сірої речовини гомогенізують упродовж 1 хв у блендері Уоринга (1500 об/хв) з 200 мл розчину 2 й осаджують

протягом 20 хв за 17 300 g у центрифугі "Sorvall", ротор "SS 34" (аналогічна вітчизняній центрифугі "ЦВР-І").

2. Осад ресуспендують у 100 мл розчину 2 і додають ДОХ у порошок до кінцевої концентрації 0,25 %. Співвідношення ДОХ і білка має лежати в межах 0,08–0,12 мг / мл.

3. Через 30 хв екстракції повторюють центрифугування в тому самому режимі, супернатант I (~ 50 мл) зберігають, а осад суспендують у 160 мл розчину 2 і після нового центрифугування отримують супернатант II (~ 110 мл). Подвійний супернатант доводять розчином 2 до 200 мл і додають тиоціанат натрію у кристалах (до концентрації 1 моль/л), після розчинення якого суспензію залишають на 30–120 хв за кімнатної температури й перемішують.

Таблиця 13. Вихід білка й активність Na^+, K^+ -АТФази на різних етапах виділення препарату з 50 г тканини мозку бика [39]

	V, мл	Білок, мг	Na^+, K^+ -АТФаза		Mg^{2+} -АТФаза	
			мкмоль P_i /год	мкмоль P_i /мг білка за год	мкмоль P_i /год	мкмоль P_i /мг білка за год
Початковий гомогенат	200	4103	105000	25,6	52439	12,8
Осад, отриманий після центрифугування при 17 300 g	100	3335	104600	31,4	50783	15,2
Після обробки ДОХ	200	1610	126420	76,5	21475	13,3
Після обробки NASCN	100	544	96000	176,5	-	-
Кінцевий препарат	200	416	90000	216,0	-	-

4. Суміш розводять водою не менш, ніж у два рази (для зниження густини розчину) і центрифугують за 90 000 g упродовж 60 хв ("Beckman-652, ротор 42). У вказаних розведеннях препарат може бути отримано за наявності центрифуги типу "ЦВР-І" та ультрацентрифуги.

5. Готовий препарат двократно відмивають розчином 2 (100 000 g, 45 хв) і, якщо ЕДТА заважає проведенню експерименту, двократно відмивають у розчині 1. 200 мл розчину 1 використовують для зберігання й відмивання препарату, кількість якого становить близько 400 мг.

Характеристика препарату. В оптимальних умовах (АТФ (3 ммоль/л), NaCl (130 ммоль/л), KCl (20 ммоль/л), імідазол (30 ммоль/л), рН 7,4, 37 °С) активність Na^+, K^+ -АТФази свіжовиділеного препарату становить 212 ± 11 мкмоль P_i / мг білка за годину.

Використання мозкової сечовини, яка зберігалася в замороженому стані, забезпечує тим меншу активність, чим довший час зберігання (наприклад, 153 ± 3 мкмоль P_i /мг білка за годину з тканини після шести місяців зберігання). При порівнянні отриманої активності з максимально ві-

домою (7000 мкмоль P_n /мг білка) за годину можна зробити висновок, що у виділеному за даним методом препараті 3,3 % білка представлено Na^+, K^+ -АТФазою. Активність Mg^{2+} -АТФази виявляється занадто низькою навіть у разі тривалої інкубації (у присутності оубаїну (0,1–1 моль/л)). Отже, розрахунок чистоти ферменту, виходячи з наведених характеристик, становить 3 %.

7.4. ОТРИМАННЯ ОЧИЩЕНИХ СЕРЦЕВИХ МІКРОСОМ І ГОМОГЕННОЇ Ca^{2+} -АТФАЗИ

Серцевий саркоплазматичний ретикулум виконує таку саму функцію в спряженні процесів збудження й скорочення, як і його скелетний аналог. Завдяки роботі саркоплазматичного ретикулума серця забезпечується видалення Ca^{2+} з міоплазми й зниження концентрації вільних іонів Ca^{2+} поблизу міофібрил до 10^{-7} моль/л. Транспорт іонів Ca^{2+} в порожнину мембранних пухирців СР є енергозалежним процесом і відбувається за рахунок енергії гідролізу АТФ специфічним високомолекулярним ($M_r \sim 10$ кДа) ферментом, Ca^{2+} -залежною АТФазою. Цей фермент є водночас переносником іонів Ca^{2+} і головним білковим компонентом очищеного серцевого СР.

Отримання очищеного серцевого СР є важким завданням, оскільки у фракції серцевих мікосом у значній кількості присутні мітохондріальні та лізосомальні домішки. За даними електронної мікроскопії, лише 5–10 % загальної кількості пухирців у мікосомальній фракції, отриманій із серцевого м'язу, припадає на фрагменти СР [39]. Високе забруднення фракції серцевих мікосом перешкоджає отриманню з них високоактивних і високоочищених препаратів Ca^{2+} -АТФази.

Представлений метод використовується для отримання із серцевого м'язу трьох препаратів СР: а) неочищених, грубих мікосом; б) мікосом, звільнених від актоміозину (KCl-мікосоми); в) очищених мікосом (кальційоксалатний препарат). За активністю Ca^{2+} -залежної АТФази, здатністю поглинати іони Ca^{2+} та утворювати фосфофермент, а також за білковим складом останній препарат наближається до високоактивних препаратів мікосом, ізольованих від скелетних м'язів [39]. Наявність очищеного препарату серцевих мікосом дозволяє отримати з них гомогенні високоактивні препарати Ca^{2+} -залежної АТФази.

Матеріали й реактиви

Розчини, які використовуються для виділення й очищення серцевих мікосом, мають бути максимально чистими. KCl кристалізується з підігрітого розчину, попередньо профільтрованого. Дезоксихолієва кислота звільняється від домішок. Розчини готують на бідистильованій воді.

Використані середовища:

1) *середовище виділення:* сахароза (0,3 моль/л), азид натрію або калію (1–5 ммоль/л), трис-HCl (3 ммоль/л, рН 8,3). За відсутності азиду

натрію в середовище виділення можна додати аскорбат (5 ммоль/л) або дитіотреїтол (5 ммоль/л);

2) *середовище зберігання мікросом*: 40 % сахароза, трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,2);

3) *середовище очищення від актоміозину*: а) КСІ (1,2 моль/л), ЕГТА (4 ммоль/л), АТФ (4 ммоль/л), $MgCl_2$ (6 ммоль/л), трис-НСІ (20 ммоль/л, рН 7,8); б) КСІ (0,6 моль/л), ЕГТА (2 ммоль/л), АТФ (4 ммоль/л), $MgCl_2$ (3 ммоль/л), трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,6);

4) *середовище завантаження мікросом оксалатом кальцію*: КСІ (0,16 моль/л), оксалат калію (25 ммоль/л), азид (10 ммоль/л), АТФ (20 ммоль/л), $MgCl_2$ (30 ммоль/л), імідазол (30 моль/л) або трис-НСІ (60 ммоль/л, рН 6,7);

5) *середовище для приготування градієнта*: а) 60 % сахароза, КСІ (0,6 моль/л), АТФ (3 ммоль/л), $MgCl_2$ (5 ммоль/л), оксалат калію (6,5 моль/л), трис-НСІ (10 ммоль/л) або імідазол (рН 6,65), азид (5 ммоль/л); б) 25 % сахароза, КСІ (0,1 моль/л), АТФ (8 ммоль/л), $MgCl_2$ (10 ммоль/л), оксалат калію (6,5 ммоль/л), трис-НСІ (10 ммоль/л) або імідазол, рН 6,65, азид (5 ммоль/л);

6) *середовище для вимірювання АТФази за виділенням P_n у середовище*: КСІ (0,1 моль/л), АТФ (5 ммоль/л), $MgCl_2$ (6 ммоль/л), азид (4 ммоль/л), імідазол (15 ммоль/л, рН 7,0);

7) *середовище для вимірювання АТФази й поглинання Ca^{2+} рН-метричним методом*: КСІ (0,1 моль/л), АТФ (5 ммоль/л), $MgCl_2$ (6 ммоль/л), азид (4 ммоль/л), оксалат (6,5 моль/л), імідазол (3 ммоль/л) або трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 7,0);

8) *середовище попередньої стабілізації мікросом*: сахароза (0,25 моль/л), трис-НСІ (10 ммоль/л, рН 8,0);

9) *середовище для солюбілізації Ca^{2+} -залежної АТФази*: сахароза (0,66 моль/л), гістидин (1 ммоль/л), трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 7,6);

10) *середовище для суспендування Ca^{2+} -залежної АТФази*: сахароза (1 моль/л), гістидин (1 ммоль/л), трис-НСІ (50 ммоль/л, рН 8,0).

Очищення сахарози. Особливу увагу слід приділити чистоті сахарози – основного компонента середовища виділення й зберігання серцевих мікросом.

1) 2 кг сахарози розчиняють у скляному стакані в 0,8 л бідистильованої води при нагріванні й інтенсивному перемішуванні. До нагрітого розчину обережно доливають 2,2 л перегнаного етилового спирту;

2) розчин швидко профільтровують крізь паперовий фільтр за допомогою лійки Бюхнера й колби Вюрца. Колбу слід попередньо нагріти. Розчин залишають протягом ночі в холодній кімнаті при постійному перемішуванні за допомогою мішалки;

3) осад, який випав, промивають на паперовому фільтрі холодним спиртом (приблизно 0,5 л). Сушать сахарозу на повітрі, перемішуючи до зникнення запаху спирту.

Більш високого ступеня очищення сахарози можна досягти при обробці розчину активованим вугіллям (10 г/л) на першій стадії. У цьому разі перед тим, як відфільтрувати розчин, активоване вугілля осаджують центрифугуванням за 2500 об/хв протягом 1 год.

Вихідний матеріал. При виборі об'єкта дослідження слід звернути увагу на такі важливі параметри: 1) доступність і кількість вихідного матеріалу; 2) вихід білка у фракцію мікросом; 3) активність Ca^{2+} -залежної азидстійкої АТФази; 4) здатність мікросом поглинати іони Ca^{2+} у присутності оксалату.

Для отримання достатньої кількості очищених серцевих мікросом ("кальційоксалатний препарат") необхідно на стадії гомогенізації мати 200–300 г серцевого м'яза. Це є еквівалентним (приблизно) двом серцям собаки, 100 серцям голуба або кроля. Вихід білка у фракцію "грубих" мікросом становить від 1 до 3 мг на м'яз; для бика дане значення знижується до 0,5–1 мг; найбільш високою АТФазною активністю характеризуються мікросоми, ізольовані із серця собаки, морської свинки, голуба та щура. Найменш активними є препарати із серця бика.

Таким чином, найзручнішим об'єктом для отримання очищених серцевих мікросом є собака та голуб. Отримані серцеві м'язи слід терміново піддавати гомогенізації або заморозити в рідкому азоті. М'язи серця можна зберігати за температури $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (у присутності сухого льоду) упродовж одного–двох місяців. Зберігання в цих умовах майже не впливає на активність виділених ферментів саркоплазматичного ретикулула.

Хід роботи

Гомогенізація. Досягнення оптимальних умов на цій стадії виділення гарантує високу якість препарату. Для подрібнення серцевого м'яза слід використовувати ножовий гомогенізатор типу "Virtis-45". Ножі бажано гострити перед кожним дослідом. Як активність, так і вихід білка мікросом визначаються швидкістю й часом подрібнення. Слід, якщо це можливо, збільшувати швидкість подрібнення, зменшуючи час гомогенізації. Занадто велика піна у стакані при гомогенізації знижує якість препарату. Для уникнення нагрівання під час гомогенізації стакан із серцевим м'язом поміщають у льодяну баню. Усі наступні операції проводять за температури від 0 до $2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Центрифугування за низьких обертів ротора проводять у скляних стаканах. Усі інші матеріали тією чи іншою мірою знижують активність препарату. У подальшому слід користуватися нітроцелюлозними центрифужними пробірками.

Зберігання препаратів мікросом. Для уникнення швидкого падіння активності серцевих мікросом процедуру очищення від актоміозину здійснюють якомога швидше, крім того, використовують середовище зберігання з 40–50 % сахарозою. У таких умовах препарати можна зберігати від одного до декількох місяців (за температури $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Виділення фракції "грубих мікросом" із серця голуба.

1. Серце швидко видаляють з грудної клітки декапітованого голуба, очищають від жиру, промивають під сильним струменем дистильованої води й заморожують у рідкому азоті.

2. Перед гомогенізацією 27 г м'язів розморожують упродовж 4 хв у 180 мл льодяного середовища виділення. М'язи подрібнюють у гомогенізаторі "Virtis-45" упродовж 15 с за 45000 об/хв і 15–25 с за 31 000 об/хв.

3. Уламки клітин, міофібрили та мітохондрії осаджують за 10 000 г (можливе також ступеневе центрифугування: спочатку за 500–600 г видаляються уламки клітин і міофібрили, мітохондрії осаджуються потім за 10 000 г протягом 15 хв).

4. Надосадову рідину пропускають крізь чотири–шість шарів марлі й центрифугують за 32 000 г протягом 60 хв. Отриманий осад ("грубі мікросоми") суспендують у середовищі зберігання, швидко заморожують або відразу використовують для подальшого очищення саркоплазматичного ретикулула.

Видалення міофібрил. Суспензію "грубих мікросом" розводять рівним об'ємом середовища 3а і трьома об'ємами середовища 3б за концентрації білка 2–5 мг/мл і через 25–40 хв центрифугують протягом 60 хв за 73 000 г. Осад ("KCl-мікросоми") суспендують у середовищі зберігання.

Приготування градієнта. У 38 мл нітроцелюлозну центрифужну пробірку наливають 3,5 мл середовища 5а. Лінійний градієнт концентрацій сахарози, KCl та інших речовин створюють, змішуючи відповідним чином 7 мл середовища 5а і 3 мл середовища 5б. Проби з градієнтами вищеописаних речовин поміщають на 12–18 год у холодну кімнату.

Очищення пухирців саркоплазматичного ретикулула осадженням з оксалатом кальцію.

1. До суспензії "KCl-мікросоми" (3–10 мг білка / мл) додають рівний об'єм середовища 4. Кінцевий об'єм становить від 100 до 120 мл. Отриману суспензію інкубують за 16–18 °С при перемішуванні й, реєструючи зміни рН (див. нижче), додають порціями по 0,1–0,2 мл 0,1 моль/л розчину CaCl_2 до того, поки насичення пухирців оксалатом кальцію не досягає 15–20 %.

2. Максимальну кальційоксалатну ємність визначали за допомогою рН-метричного методу безпосередньо перед дослідом (див. нижче). Значення рН суспензії підтримують у межах 6,45–6,7. Після закінчення процедур насичення рН доводять до 6,65.

3. Суспензію мікросом, що поглинули оксалат кальцію, швидко охолоджують на льоді й порціями по 16–20 мл нашаровують на пробірки з градієнтом концентрації сахарози, KCl та ін. Центрифугування проводять у шести пробірках ротора "SW-27" на ультрацентрифузі "Spinco" L 3-50, за 25 000 об/хв упродовж 2–5 год. У результаті центрифугування спостерігається розділення на кілька шарів.

4. Обережно відсмоктують верхні темні шари, а осад з надосадовим шаром розводять двома–трьома об'ємами KCl (0,6 моль/л) і переоса-

джують за 73 000 г протягом 60 хв. Кінцевий осад ("кальційоксалатний препарат") суспендують у середовищі зберігання за концентрації білка 5–15 мг/мл.

5. Концентрацію білка в суспензії мікросом визначають за допомогою методу Лоурі (див. розділ 2, 5), використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін.

Визначення активності Ca^{2+} -залежної АТФази за виділенням P_n у середовище. Даний метод дозволяє протягом 1,5 год здійснити до 40 визначень АТФазної активності.

1. До 1 мл середовища 6, яке попередньо інкубують упродовж 10 хв у скляній пробірці на 10 мл за 37 °С, додають 20–200 мкг білка препарату серцевих мікросом. Через 3–5 хв реакцію зупиняють додаванням 1 мл 6 % HClO_4 , після чого пробірку ставлять у лід. У контрольній пробірці порядок додавання білка та HClO_4 змінюють на зворотний.

2. Після закінчення реакції в усій серії проби центрифугують упродовж 10 хв за 4 000 об/хв (центрифуга "Е-23"). Супернатант зливають в окрему пробірку, додають до нього 3 мл ацетатного буфера (10,8 мл CH_3COOH (17 ммоль/л), 74,8 г ацетату натрію, об'єм доводять до 2 л), 0,5 мл 1 % аскорбінової кислоти в CuSO_4 (1 ммоль/л), а також 0,5 мл 1 % молібдату амонію в 0,005 н H_2SO_4 . Суміш повільно перемішують.

3. Через 20–30 хв забарвлені проби спектрофотометрують за 700 нм. 1000 нмолям P_n у пробі відповідає екстинкція близько 0,08 од. оптичної густини. Для встановлення точної кількості розщепленого АТФ будують калібрувальний графік з різними концентраціями KH_2PO_4 (від 100 до 800 нмолів).

При використанні середовища 6 вимірюється загальна азидстійка АТФазна активність. За відсутності азиду також реєструватиметься додаткова мітохондріальна АТФаза, а при додаванні специфічного комплексу іонів Ca^{2+} -ЕГТА (1 ммоль/л) – Mg^{2+} -залежна АТФаза. В обох випадках будують окремі калібрувальні криві. Слід зазначити, що частина активності Ca^{2+} -залежної АТФази при її вимірюванні вищеописаним методом перебуватиме в заінгібованому стані. Це інгібування знімається низькими (0,01–0,1 %) дозами детергента, наприклад, тритону X-100. Оптимальне співвідношення детергент – білок слід підбирати в кожному конкретному випадку.

Загальна характеристика методу очищення мікросом. Застосовуваний метод дозволяє отримати з 270 г серцець голубів у середньому близько 700 мг "грубих" мікросом, 450 мг "KCl-мікросом", 30–45 мг "кальційоксалатного препарату". З 270 г міокарду собаки тим самим методом можна отримати близько 540 мг "грубих" мікросом, 300 мг "KCl-мікросом" і 25 мг "кальційоксалатного препарату" (дані одного виділення).

У процесі центрифугування у градієнті густини сахарози в "кальційоксалатному препараті" зосереджується в середньому близько 37 % вихід-

ної активності Ca^{2+} -залежної АТФази завантаженого препарату "Ксі-мікросом" і близько 35 % вихідного поглинання кальцію. Згасання активностей у процесі очищення становить від 10 до 20 %.

Характеристики препарату. Використаний метод є методом осадження серцевих мікросом, повністю завантажених оксалатом кальцію. 100 % завантаження оксалатом кальцію не дозволяє, проте, отримати препарати з високою активністю Ca^{2+} -залежної АТФази, і везикули, як правило, не здатні поглинати кальцій. Відносно невелике збільшення активності цього ферменту у процесі очищення, можливо, пов'язано з інігуючою та, ймовірно, незворотною дією високих доз оксалату кальцію на мембрани саркоплазматичного ретикулума. Застосування цього методу дозволяє подолати ці суттєві недоліки (табл. 14).

З даних, наведених у табл. 14, видно, що центрифугування частково завантажених пухирців у градієнті густини сахарози викликає збільшення активності Ca^{2+} -залежної АТФази в чотири рази та зростання співвідношення Ca^{2+} і АТФ у 1,45 рази, препарати поглинають значну кількість кальцію. В очищеному препараті рівень цитохромів ($a + a_3$) виступає надійним маркером мітохондріальних домішок. Головні білкові компоненти препарату, пов'язані з роботою "кальцієвого насоса", – білки з молекулярною масою 200–105 kDa (Ca^{2+} -залежна АТФаза) і 55–65 kDa (Са-секвестрин Мак-Ленана) – становлять уже переважну (близько 50 і 30 % відповідно) частину загального білка ретикулума.

Отримані препарати за основними характеристиками – активністю Ca^{2+} -залежної АТФази, швидкістю поглинання кальцію, білковим складом і низьким рівнем мітохондріальних домішок – наближаються до високоочищених препаратів саркоплазматичного ретикулума скелетного м'яза. Ці результати свідчать про те, що системи "кальцієвого насоса" СР серцевого і скелетного м'язів можуть бути близькими, якщо не ідентичними, за структурою та, ймовірно, за механізмом дії.

Виділення гомогенної Ca^{2+} -залежної АТФази. Отримання гомогенного й високоактивного препарату ферменту Ca^{2+} -залежної АТФази ретикулума серцевого м'яза є можливим лише за наявності препарату очищених серцевих мікросом, звільненого від мітохондріальних домішок. Схема отримання ферменту мало відрізняється від процедури, яка застосовується для серцевих мікросом.

1. При виділенні Ca^{2+} -залежної АТФази "кальцій-оксалатний препарат" суспендують у середовищі 8 за концентрації білка 22 мг/мл.

2. До суспензії додають дитіотреїтол і КСІ до кінцевої концентрації 3 ммоль/л і 1 моль/л, відповідно, і 10 % дезоксихолату натрію у співвідношенні 0,09 мг/мг білка. Через 30 хв суспензію центрифугують упродовж 20 хв за 190 000 g.

Таблиця 14. Очищення мікросом серцевого м'яза голуба [39]

Препарат мікросом	Ca ²⁺ -залежна АТФаза, кмоль P _n /(хв · мг білка)	Поглинання Ca ²⁺ , кмоль Ca ²⁺ /мг білка	Mg ²⁺ -залежна АТФаза, кмоль P _n /(хв · мг білка)	Ca ²⁺ / АТФ	Цитохроми (a + a ₃), нмоль/мг білка
"Грубі" мікросоми	0,54±0,07	2,04±0,40	0,19±0,01	0,090±0,07	0,43±0,10
"КСІ-мікросоми"	0,82±0,14	2,96±0,70	0,15±0,02	0,89±0,05	0,62±0,14
Очищення у градієнті густини сахарози	0,49±0,04	1,24±0,33	0,16±0,02	0,60±0,05	0,80±0,22
І шар кальційоксалатний препарат	3,25±0,60	10,94±2,46	0,48±0,22	1,29±0,05	0,18±0,08

Як вихідний матеріал для отримання серцевих мікросом використовували як свіжі, так і заморожені серця голубів. Концентрацію відновлених цитохромів (a + a₃) вимірювали за довільною схемою за 604–630 мн на спектрофотометрі.

3. Супернатант, який містить частково солюбілізований білок M55, обережно відсмоктують, осад суспендують у середовищі 9 за концентрації білка 13–15 мг/мл. До суспензії додають дитіотреїтол до кінцевої концентрації 3 ммоль/л, 50 % насичений ацетат амонію – 0,20 мл/мл суспензії й дезоксихолат натрію у співвідношенні 0,4 мг/мг білка. Через 40 хв препарат, який посвітлішав, центрифугують упродовж 20 хв за 190 000 g.

4. Густий осад, який містить несолюбілізований матеріал, суспендують у середовищі 10, до супернатанту додають ацетат амонію з розрахунку 0,01–0,03 мл/мл середовища до легкого помутніння. Після центрифугування за 190 000 g упродовж 30 хв відбирають прозорий супернатант і невеликий осад, який містить частково інактивованим фермент.

5. До супернатанту додають ацетат амонію до 0,27–0,30 мл/мл суспензії, в якій моментально спостерігається помутніння. Через 15 хв інкубації за 0 °C препарат центрифугують упродовж 20 хв за 190 000 g.

6. Супернатант обережно відсмоктують, жовтуватий осад, який містить Ca^{2+} -залежну АТФазу, розчиняють у середовищі 10 і зберігають на льоді.

Зазвичай вся процедура від стадії гомогенізації до виділення очищеного ферменту займає два дні. У перший день виконуються всі стадії попереднього очищення мікросом аж до нашарування везикул з оксалатом кальцію на градієнт концентрації сахарози й KCl. Центрифугування завантажених оксалатом кальцію везикул проводять протягом ночі. Очищення Ca^{2+} -залежної АТФази здійснюють наступного дня.

Отриманий фермент при електрофорезі в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію виявляється у вигляді однієї смуги з молекулярною масою 100–105 кДа. За даними п'яти виділень, питома активність Ca^{2+} -залежної АТФази серцевого м'яза голуба становить 10–12 мкмоль P_{H} /(хв · мг білка) і навіть досягає 16 мкмоль P_{H} /(хв · мг білка). Питома активність ферменту, отриманого тим самим методом із скелетного м'яза кроля, варіює від 10 до 24 мкмоль P_{H} /(хв · мг білка).

8. ВИДІЛЕННЯ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ

8.1. СОЛЮБІЛІЗАЦІЯ Й ОЧИЩЕННЯ НІКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛІНОВОГО РЕЦЕПТОРА З ЕЛЕКТРИЧНОГО ОРГАНА СКАТА (*TORPEDO CALIFORNICA*)

Методи очищення мембранних білків за допомогою детергентів набули широкого використання в сучасній біохімії. Даний метод виділення ацетилхолінового рецептора (АцХР) з електричного органа ската (*Torpedo californica*) базується на солюбілізації цього білка з використанням холату [7]. На першому етапі отримують мембранну фракцію з електричних органів методом ультрацентрифугування, потім здійснюють

очищення ацетилхолінового рецептора (за допомогою афінної хроматографії на колонці з афігелем 401 (на колонку наносять мембранну фракцію в детергентному розчині холату натрію), отриманий білок аналізують на сульфгідрильні групи.

Зазвичай з 200 г електричних пластинок можна отримати приблизно 20 мг очищеного АцХР. Важливо, щоб ліпіди спеціально було внесено до детергентного розчину на стадії афінної хроматографії. Якщо ліпіди не додавати, то виділений препарат АцХР не дає функціонально активних іонних каналів за подальшої реконструкції.

8.1.1. Виділення мембран з електричного органа ската *Torpedo californica*

Усі операції виконують за температури 0–4 °С і якомога швидше.

Матеріали й реактиви

Буфер для гомогенізації БГ-4: фосфат натрію (10 ммоль/л) у розчині 1,38 г Na_2HPO_4 на 1 л, ЕДТА (1,85 г/л), 5 ммоль/л ЕГТА (1,90 г/л), 0,02 % NaN_3 (0,2 г/л), рН 7,5; *буфер для діалізу (БД-1)*: NaCl (100 ммоль/л) (5,84 г/л), МОРПС (10 ммоль/л) (3-(N-morpholino) propanesulphonic acid) (2,09 г/л), ЕДТА (0,1 ммоль/л) (0,037 г/л), 0,02 % NaN_3 (0,2 г/л), рН 7,4; йодацетат; ФМСФ (в етанолі) (200 ммоль/л).

Хід роботи

1. Частково розморожують 200 г електричних органів ската *T. californica*, нарізають ножицями або скальпелем на невеликі шматки (1 cm^3) і поміщають їх у стакан ємністю 600 мл.

2. Додають 200 мл буфера для гомогенізації (БГ-4).

3. Додають, постійно перемішуючи, 0,4 г йодацетату і 0,2 мл ФМСФ (200 ммоль/л, в етанолі), щоб отримати концентрацію йодацетату 1 мг/мл і ФМСФ – 0,1 ммоль/л (обидва речовини є протеазними інгібіторами).

4. Гомогенізують чотири рази по 30 с за допомогою гомогенізатора.

5. Центрифугують за 5000 g упродовж 10 хв у роторі "Sorvall GSA" (або за 5000 g у роторі "SS-34").

6. Фільтрують надосадову рідину крізь чотири шари марлі.

7. При бажанні можна ресуспендувати осад, отриманий після центрифугування, у 80 мл буфера БГ-4 і повторити операції п. 3–6, додаючи 0,2 г йодацетату і 0,1 мл ФМСФ.

8. Об'єднаний фільтрат центрифугують у роторі "Ту-35" (центрифуга "Beckman") за 30 000 об/хв упродовж 60 хв або в роторі "Ту-19" за 19 000 об/хв упродовж 125 хв (за великомасштабного виділення може знадобитися кілька центрифугувань у роторі "Ту-35").

9. Суспендують осад у 5–10 мл буфера для діалізу (БД-1). Щоб отримати гомогенну суспензію, слід використовувати ручний гомогенізатор. Розливають суспензію по морозостійких пробірках і заморожують у рідкому азоті.

8.1.2. Солюбілізація й очищення нікотинового ацетилхолінового рецептора зі ската *Torpedo californica*

Усі операції виконують за 0–4 °С.

Матеріали й реактиви

20 % холат натрію в буфері БД-1; буфер БД-2 (БД-1 + 1 % холат); колонка з афігелем 401/бром ацетилхоліном; буфер БД-3 (БД-1 + 1 % холат + 1 мг/мл ДОФХ); приготування ДОФХ (діолеїлфосфатидилхолін): ДОФХ висушують і суспендують у буфері БД-1 + 1 % холат (зазвичай 10 мл розчину ДОФХ (20 мг/мл у хлороформі) упарюють на роторному випарнику, висушують упродовж 1–3 год у вакуумному ексикаторі і потім розчиняють у 200 мл буфера БД-3. 50 мл буфера БД-3 залишають для стадії 11. Якщо необхідно, саме на цій стадії можна замінити один ліпід на інший або довести співвідношення ліпід : білок до потрібної величини; буфер БД-4 (БД-3 + карбамілхолінхлорид (10 ммоль/л)), приготований розчиненням 91 мг твердого карбамілхолінхлориду в 50 мл буфера БД-3; ацетат (0,001 моль/л), рН 4.

Хід роботи

1. Розморожують фракцію мембран ската *T. californica*, виділену з 200 г електричних органів.
2. Розводять препарат до концентрації 2 мг/мл за білком буфером БД-1 (для мембран, виділених з 200 г тканини, достатньо 200 мл).
3. Постійно перемішуючи, додають 10 мл 20 % холату натрію в буфері БД-1, щоб кінцева концентрація холату становила 1 %.
4. Обережно перемішують упродовж 20 хв.
5. Центрифугують за 34 000 об/хв у роторі "Ту-35" упродовж 45 хв. За цей час готують колонку для афінної хроматографії для очищення ацетилхолінового рецептора, промиваючи буфером БД-2.
6. Відокремлюють надосадову рідину й залишають її для подальшого очищення за допомогою афінної хроматографії на колонці.
7. Промивають колонку з афігелем 401 / бромацетилхоліном буфером БД-2.
8. Наносять надосадову рідину на колонку об'ємом 25 мл зі швидкістю 1,5 мл/хв.
9. Пропускають крізь колонку щонайменше три (75 мл) об'єми буфера БД-3.
10. У ході промивання збирають фракції й вимірюють їх оптичну густину за 280 нм. У кінці промивки оптична густина має бути на рівні базової лінії.
11. Елюють ацетилхоліновий рецептор 50 мл буфера БД-4.
12. Об'єднують фракції, які складають хроматографічний пік (зазвичай це фракції з $\epsilon_{280} > 0,5$), і визначають загальний об'єм і середнє значення ϵ_{280} . Концентрацію білка (в мг/мл) розраховують як $0,6 \cdot \epsilon_{280}$.

13. Зберігають очищений ацетилхоліновий рецептор за 0–4 °С. Очищені фракції якомога швидше використовують для реконструкції.

14. Промивають колонку кількома об'ємами БД-1, а потім ацетатом (0,001 моль/л, рН 4).

8.1.3. Підготовка колонки для очищення ацетилхолінового рецептора за допомогою афінної хроматографії

Для мембранного препарату, виділеного з 200 г тканини, достатньо колонки об'ємом 25 мл. Описана нижче методика розрахована на колонку об'ємом 50 мл. Цю методику можна модифікувати для проведення очищення в меншому масштабі.

Матеріали й реактиви

Афігель ("BioRad"), поміщений у колонку розміром 1,5 x 20 см; дитіотреїтол (ДТТ) (20 ммоль/л) у трис-НСІ буфері (0,1 моль/л, рН 8,0); буфер, який містить NaCl (100 ммоль/л) та фосфат натрію (50 ммоль/л, рН 7,0); бромацетилхолін; йодацетамід.

Хід роботи

1. До 50 мл афігелю, поміщеного в колонку розміром 1,5 x 20 см додають 50 мл ДТТ (20 ммоль/л) у трис-НСІ буфері (0,1 моль/л, рН 8,0), добре перемішують і залишають на 20 хв.

2. Промивають колонку водою, щоб видалити ДТТ. Аналізують гель і останню порцію розчину для промивання на присутність сульфгідрильних груп. Їх вміст у цьому розчині має бути на рівні фону.

3. Додають до гелю, який міститься в колонці, рівний об'єм буфера (NaCl (100 ммоль/л) і фосфат натрію (50 ммоль/л), рН 7,0). Добре перемішують, додають 300 мг бромацетилхоліну й відразу ж перемішують суспензію гелю струшуванням (висока концентрація фосфату необхідна для підтримання рН 7,0).

4. Промивають колонку водою й проводять аналіз гелю на вміст вільних сульфгідрильних груп. Їх вміст у гелі має бути дуже низьким. Якщо необхідно, повторюють обробку бромацетилхоліном.

5. Додають 50 мг йодацетаміду для алкілювання всіх залишкових сульфгідрильних груп і пригнічення росту мікроорганізмів. Зберігають колонку, доки вона не знадобиться.

6. Колонку можна використовувати кілька разів (зазвичай три рази упродовж трьох–чотирьох тижнів). Щоб звести гідроліз ліганду до мінімуму, колонку заповнюють буфером з низькою іонною силою за рН 4. Якщо вихід очищеного ацетилхолінового рецептора стає нижчим 50 % в оптимального, то час готувати нову колонку.

8.1.4. Аналіз на сульфгідрильні групи

Матеріали й реактиви

Розчин динітробензоату (ДТНБ) (10 ммоль/л; 39,6 мг на 10 мл; обережно титрують NaOH до рН 7,0); трис-НСІ буфер (0,1 моль/л, рН 8,0).

Хід роботи

1. Готують вихідний розчин ДТНБ (10 ммоль/л) і зберігають його в замороженому стані.

2. Додають 0,33 мл ДТНБ (10 ммоль/л) до 10 мл трис-НСІ буфера (0,1 моль/л, рН 8,0).

3. До 50 мкл гелю або до 50 мкл елюату додають 1 мл розведеного розчину ДТНБ.

Якісний аналіз можна проводити за зміною забарвлення – відновлений гель має яскраво-жовтий колір. Після іммобілізації бромацетилхоліну гель не повинен забарвлюватися. Кількісний аналіз можна виконувати, вимірюючи оптичну густину за 412 нм для зваженого зразка гелю, з якого відсмоктуванням видалено надлишок гелю. Проте у більшості випадків достатньо якісної реакції.

Отримання бромацетилхоліну

1. До 18,4 г (0,1 моля) твердого холінброміду додають по краплинах при постійному перемішуванні 24,4 г (0,1 моля) бромацетилброміду.

2. Реакційну суміш витримують упродовж 40 хв. В'язку суміш охолоджують у льодяній бані та перемішують ще протягом 75 хв.

3. До суміші повільно додають 75 мл абсолютного етанолу. Білий кристалічний осад відфільтровують при відсмоктуванні.

4. При перекристалізації з 400 мл ізопропанолу отримують кристали з температурою плавлення 136–138 °С. Вихід зазвичай становить 24 г.

8.2. РОЗДІЛЕННЯ ПЕРИФЕРИЧНИХ ТА ІНТЕГРАЛЬНИХ БІЛКІВ МЕМБРАН У ДВОФАЗНІЙ СИСТЕМІ

За даним методом можна провести розділення периферичних та інтегральних мембранних білків у двофазній системі [7]. При цьому важливо застосувати детергент тритону Х-114, який дозволяє створити за 20 °С дві фази – водну й детергентну. Після проведення ультрацентрифугування у градієнті густини сахарози гідрофільні (периферичні) білки мембран концентруються у водній фазі, а гідрофобні – у детергентній.

Для ефективного розділення необхідно отримати гомогенний препарат тритону Х-114.

Матеріали й реактиви

Тритон Х-114 (10 г); бутилзаміщений гідрокситолуол (8 мг); розчин фосфату калію (20 ммоль/л, рН 7,5), який містить КСІ (0,15 моль/л); фо-

сфатний буфер (рН 7,4), який містить NaCl (150 ммоль/л) або KCl; 6 % сахароза; мембранний препарат.

Хід роботи

Отримання гомогенного препарату тритону X-114.

1. Додають 10 г тритону X-114 і 8 мг бутилзаміщеного гідрокситолуолу до розчину фосфату калію (20 ммоль/л, рН 7,5), який містить KCl (0,15 моль/л). Кінцевий об'єм суміші має становити 200 мл.

2. Охолоджують суміш до 0°C, щоб упевнитись у повному розчиненні компонентів, і потім інкубують її протягом ночі за 35°C.

Очищений детергент за температур вище 20–25°C утворює окрему фазу меншого об'єму, яку можна виділити м'яким центрифугуванням і піддавати, якщо необхідно, повторній обробці. Солюбілізацію мембран проводять таким чином.

Солюбілізація мембран з використанням тритону X-114.

1. За 0–4 °C додають тритон X-114 до концентрації 2 % до мембранного препарату (1–3 м/мл за білком) у трис-HCl або у фосфатному буфері (рН 7,4), який містить NaCl або KCl (150 ммоль/л).

2. Інкубують суміш за 0–4 °C упродовж 1 год і потім центрифугують за 100 000 g упродовж 1 год для видалення нерозчинного матеріалу.

3. Розчин наносять на шар забуференої 6 % сахарози в центрифужній пробірці.

4. Нагрівають до 25–30 °C за 5 хв і потім центрифугують протягом 5 хв за 100 g і температури вище 20 °C.

5. Фаза детергента утворює маслянистий шар на дні пробірки. Водну фракцію можна знову змішати з 0,5 % (в/о) тритоном X-114, а детергентну фазу – з водним буфером і повторити процес.

8.3. ПРОВЕДЕННЯ СОЛЮБІЛІЗАЦІЇ

Й ОТРИМАННЯ БІЛКОВОЇ ФРАКЦІЇ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗИВ [33]

Матеріали й реактиви

Фракція плазматичних мембран; KCl (0,6 моль/л); трис-малеат (80 ммоль/л) у сахарозі (0,25 моль/л, рН 7,2); середовище для гомогенізації: на 3 мг мембранного білка SDS (10 ммоль/л), NaCl (8 ммоль/л), трис-малеату (2,5 ммоль/л), β-меркаптоетанолу (0,5 ммоль/л, рН 7,4); розчин 1: NaCl (8 ммоль/л), трис-малеат (2,5 ммоль/л), β-меркаптоетанол (0,5 ммоль/л, рН 7,4); сахароза (0,25 моль/л); дисоціюючий буфер для електрофорезу: 1 % SDS у трис-гліциновому (електродному) буфері, рН 8,0; 6 г трис і 28,8 г гліцину розчиняють у воді і доводять об'єм до 1 л дистильованою водою (концентрації речовин у буфері – 5 ммоль/л трису, 5 ммоль/л гліцину, 0,5 ммоль/л EDTA, рН 8,0); 5 % β-меркаптоетанол.

Хід роботи

1. Фракцію плазматичних мембран отримують з клітин гладеньких м'язів кроля (див. розділ 2, 4.1.1.). Білки солюбілізують розчином високої іонної сили. Для цього фракцію ПМ екстрагують KCl (0,6 моль/л), трис-малеатом (80 ммоль/л) у розчині сахарози (0,25 моль/л, рН 7,2) упродовж 1 год за 2 °С.

2. Проби центрифугують за 105 000 g протягом 1 год, потім ресуспендують сахарозою (0,25 моль/л) і знову центрифугують за 105 000 g.

3. Отриманий осад гомогенізують в 1 мл середовища такого складу: на 3 мг мембранного білка SDS (10 ммоль/л), NaCl (8 ммоль/л), трис-малеату (2,5 ммоль/л), β-меркаптоетанолу (0,5 ммоль/л), рН 7,4.

4. Отриманий розчин діалізують за 2 °С протягом 36 год проти розчину 1. Під час діалізу з діалізату видаляються 97–98 % детергента.

5. Для видалення з діалізату матеріалу, який осаджується, його центрифугують упродовж 30 хв за 48 000 g. Супернатант міститиме близько 95 % усіх мембранних білків. Концентрацію білка визначають за методом Лоурі (див. розділ 2, 5).

6. Супернатант беруть для фракціонування білків методом електрофорезу.

Електрофорез у ПААГ

Електрофорез проводять на пластинках (7 x 10 см) 5 % ПААГ за рН 7,2.

Для приготування зразка білковий препарат змішують із сахарозою (2 моль/л) так, щоб кінцева концентрація білка становила 1 мг/мл. Зважують на вагах по 0,5 мг білків-стандартів і розчиняють кожну порцію в 0,5 мл дисоціюючого буфера (1 % SDS у трис-гліциновому (електродному) буфері, рН 8,0).

1. Білки інкубують у дисоціюючому буфері протягом 1 год. при 37 °С.

2. До кожного зразку додають 0,1 мл 5 % β-меркаптоетанолу до концентрації 1 % у загальному об'ємі й швидко поміщають проби в термостат.

3. Інкубують проби в безкисневому середовищі упродовж 1 год за 37 °С. У результаті білки підлягають повній дисоціації.

8.4. РОЗДІЛЕННЯ БІЛКОВОЇ ФРАКЦІЇ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ КРОЛЯ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ НА ПЛАСТИНКАХ 5 % ПААГ [33]

Матеріали й реактиви

Білковий препарат; 8 % акриламід; 0,2 % бісакриламід; 10 % персульфат амонію; тетраметилендіамін (темед); 0,1 % SDS; трис-гліциновий буфер; гліцерин або етиленгліколь; бромфеноловий синій; 12 % ТХО; 20 % сульфосаліцилова кислота; етанол; оцтова кислота; кумасі синій.

Хід роботи

Приготування гелю

Електрофорез проводять у 5 % ПААГ, який готують таким чином:

1. Беруть 12 мл розчину, який містить 8 % акриламід у 0,12 мл бісакриламід. Щоб викликати полімеризацію, до цього розчину додають 0,12 мл 10 % персульфату амонію і 10 % TEMED. Концентрація SDS у гелі – 0,1 %.

2. Суміш швидко наносять на пластинки. Перед тим, як відбудеться полімеризація, на акриламід нашаровують невеликий об'єм трис-гліцинового (електродного) буфера. Гель можна використовувати через 2 год.

Проведення електрофорезу.

1. По завершенню інкубації до білкового розчину додають три–чотири краплини гліцерину або етиленгліколю і три–чотири краплини 2 % розчину барвника бромфенолового синього. Загальний об'єм суміші не повинен перевищувати 1 мл.

2. Суміш ретельно перемішують і 0,1 мл її мікропіпеткою наносять на пластинку. В об'ємі, який вносять, має міститися не менше 50 мкг білка.

3. Зверху обережно нашаровують електродний буфер, який містить 1 % SDS. Слід уникати сильного охолодження розчину, оскільки SDS може випасти в осад, тому електрофорез слід проводити за кімнатної температури.

4. Після закінчення електрофорезу гель фіксують протягом ночі у 12 % ТХО або 20 % сульфосаліцилової кислоти.

5. Білки виявляють, помістивши гелі в 0,05 % розчин кумасі синього в суміші етанол – оцтова кислота – вода (10 : 1 : 30).

6. Цєю самою сумішшю відмивають надлишок барвника.

7. Вимірюють довжину пробігу кожного білка від лінії старту з точністю до 0,1 мм. Ці дані порівнюють з калібрувальною кривою (рис. 46), яку будують за даними, отриманими на білках-стандартах.

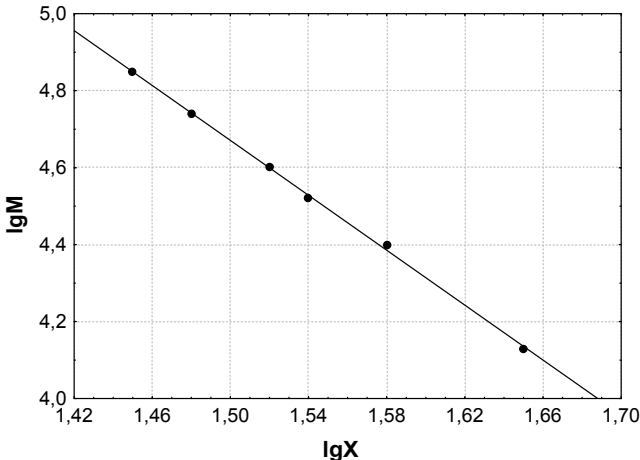


Рис. 46. Калібрувальна крива для визначення молекулярної маси дисоційованих білків [33]:
M – молекулярна маса білка; X – довжина пробігу індивідуального білка;
(точки за висхідною відповідно: альбумін бичачий; каталаза; альбумін яєчний; оксидаза, D-амінокислот; трипсин; цитохром с)

Як видно з рисунка, існує лінійна залежність рухливості білків у 5 % ПААГ від величини їхніх молекулярних мас. Це надає можливість порівнювати мембранні білки з білками-стандартами.

8.5. ЕЛЕКТРОЕЛЮЦІЯ БІЛКА З ПОЛІАКРИЛАМІДНОГО ГЕЛЮ ПІСЛЯ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ У ПРИСУТНОСТІ SDS [7]

Матеріали й реактиви

Плоскодонна камера, яку зазвичай використовують для розділення ДНК, або модифікований прилад для електрофорезу у трубках; трубки для діалізу, які кип'ятили протягом 15 хв у бікарбонаті натрію (0,1 моль/л) з ЕДТА (20 ммоль/л), потім ретельно промивали дистильованою водою; розчин барвника кумасі: 0,1 % розчин (в/о) в 50 % (о/о) водному метанолі, який містить 7 % (о/о) оцтову кислоту; розчин для відмивання барвника, який має той самий склад, але не містить кумасі; буфер, який містить трис-гліцин (25 ммоль/л, рН 8,5) і 0,1 % SDS, трис-ацетат (50 ммоль/л, рН 7,8) і 0,1 % SDS або фосфат натрію (0,1 моль/л, рН 7,8) і 0,1 % SDS; 0,1 % β-меркаптоетанол або дитіотреїтол (2–5 ммоль/л).

Хід роботи

1. Швидко (за 5–10 хв) забарвлюють гель кумасі синім, потім витримують у відмиваючому розчині, доки не з'являться смуги білка (10–15 хв). Час забарвлення й відмивання має бути якомога меншим, щоб гарантувати максимальний вихід білка при його наступній екстракції.

2. Вирізають смуги гелю з пептидами, які аналізуються. Гель не руйнують і не гомогенізують.

3. Наповнюють камеру буфером, який містить трис-гліцин (25 ммоль/л, рН 8,5) і 0,1 % SDS, трис-ацетат (50 ммоль/л, рН 7,8) і 0,1 % SDS або фосфат натрію (0,1 моль/л, рН 7,8) і 0,1 % SDS, до рівня приблизно на 1 см вище платформи. За необхідності до буфера можна додати β-меркаптоетанол (0,1 %, о/о) або дитіотреїтол (2–5 ммоль/л). Щоб гарантувати повне розчинення білків, концентрацію SDS можна підвищити до 1 % (в/о).

4. Відрізають шматок діалізної трубки такої довжини, щоб у нього помістився зразок гелю і залишилось ще по 2 см з кожного краю. Затискають трубку з одного кінця за допомогою затискача й заповнюють її буфером з камери. Поміщають вирізаний зразок гелю в трубку й обережно видавлюють з неї більшу частину рідини, а потім закривають зверху. Слід уникати проникнення в мішок пухирців повітря.

5. Закріплюють діалізний мішок на платформі електрофоретичної камери. Підганяють рівень буфера так, щоб він покривав мішок.

6. Проводять електрофорез упродовж 3–20 год за напруги 25–100 В і силі постійного струму приблизно 30 с, щоб електрофоретично десорбувати білок з поверхні діалізної мембрани. Якщо забарвлення гелю й від-

мивання барвника проводили тривалий час, то відповідно більше часу буде потрібно на елюцію.

7. Виймають зразок гелю з мішка. Забарвлюють його ще раз, щоб упевнитися в повному вимиванні білка. Усі частинки гелю, які можуть залишатися, слід повністю видалити. За необхідності розчин можна злити й швидко відцентрифугувати або відфільтрувати для видалення всіх твердих домішок. Мішок знову зачинають і діалізують розчин білка проти щонайменше п'яти змін дистильованої води (кожна зміна по 5 л) протягом двох–трьох діб за 0–4 °С. До діалізуючого розчину можна додати SDS до концентрації 0,25 % (в/о), щоб зберегти білок у розчиненому стані, але останній діаліз слід проводити тільки проти дистильованої води. Барвник кумасі весь час залишається зв'язаним з білком, завдяки чому можна контролювати хід електроелюції.

Даний метод можна використовувати за будь-якого способу забарвлення гелю і з будь-яким приладом для вертикального електрофорезу у трубках.

8.6. АНАЛІЗ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ ІЗ ЗСУВОМ ЗАРЯДУ

Інтегральні мембранні білки, ймовірно, містять протяжні гідрофобні ділянки, які полегшують їх вбудовування в ліпідний бішар. При солюбілізації в неденатуруючих умовах із цими ділянками зв'язується детергент, і ця особливість використовується при електрофорезі із зсувом заряду. Оскільки детергенти можуть бути нейтральними, позитивно та негативно зарядженими, їх зв'язування може приводити до зсуву заряду білка і відповідно до його електрофоретичної рухливості. Здатність детергентів змінювати електрофоретичну рухливість білків можна використовувати для того, щоб встановити, чи дійсно даний білок містить протяжні гідрофобні ділянки й чи можна вважати його типовим мембранним інтегральним білком. Даний метод електрофорезу із зсувом заряду можна поєднувати з імуноелектрофорезом. Єдина перевага його застосування – це схильність білка до агрегації в різних детергентах [7].

До нейтральних детергентів належать тритон X-100, октилглюкозид, луброл, емульфоген BC720 (найбільш придатний для даного методу) і дигітонін; до позитивно заряджених детергентів належить ЦТАБ (найбільш придатний для даного методу) і ДТАБ; серед негативно заряджених детергентів найбільш придатним є дезоксихолат. Заряджені детергенти зазвичай використовують у суміші з нейтральними детергентами (у співвідношеннях 1 : 1 до 1 : 10).

Матеріали й реактиви

Розчин для приготування гелю: 1 % агароза в буфері, який містить трис (37,5 ммоль/л), гліцин (100 ммоль/л, рН 7,8) і 0,5–1 % детергента; розчин для забарвлення білка: 0,1 % кумасі синього, 40 % метанолу та 7 % оцтової кислоти; ДОХ (дезоксихолат); ЦТАБ (цетилтриметиламонійбромід).

Хід роботи

1. Готують гелі на скляних пластинках (10 або 20 x 20 см), використовуючи 1 % агарозу в буфері, який містить трис 37,5 ммоль/л, гліцин (100 ммоль/л, рН 7,8) і 0,5–1 % детергента.

2. Поміщають пластини в камеру для електрофорезу (якщо це можливо, то краще охолодити її водою), яка містить відповідний буфер. З'єднують гель з буфером за допомогою паперових ґнотів.

3. Проводять попередній електрофорез з буфером упродовж 15–20 хв за напруженості електричного поля 4–5 В/см.

4. Вносять зразки (10–15 мкл розчину, який містить 10–20 мкг білка і детергент у концентрації до 5 %) в лунки (1 x 10 мм), вирізані в гелі. Стартова зона має розташовуватися приблизно на рівній відстані від найближчих ґнотів, особливо якщо білок є слабкозарядженим.

5. Проводять електрофорез упродовж 2–3 год за напруженості електричного поля 4–5 В/см.

6. Знімають гель, підсушують його в потоці теплого повітря (при цьому може знадобитися закріпити його), забарвлюють білок за допомогою розчину, який містить 0,1 % кумасі синього, 40 % метанолу та 7 % оцтової кислоти, упродовж 1–3 год і потім відмивають гель у тому самому розчині, але без барвника.

7. Білки, які зв'язують ДОХ і ЦТАБ, мають розташовуватися ближче до анода й катода порівняно з їх положенням й нейтральному детергенті, такому, наприклад, як тритон.

Цей метод є особливо інформативним у поєднанні з перехресним імуноелектрофорезом. При цьому електрофорез проводять вздовж одного краю квадратної скляної пластинки, як описано раніше. Потім ділянку агарози вище зразка видаляють і замінюють агарозою, яка містить відповідне антитіло й нейтральний детергент. Після електрофорезу у другому напрямку, проведеного в умовах, придатних для перехресного електрофорезу, утворюються смуги преципітації, що дозволяє легко виявити зсув заряду досліджуваного білка.

8.7. РОЗЩЕПЛЕННЯ БІЛКА ЗА ДОПОМОГОЮ БРОМЦІАНУ

Розщеплення білків і пептидів ефективно застосовується для отримання, наприклад, мономерних форм мембранних білків при їх хроматографічному очищенні. Хімічне розщеплення білків за допомогою бромціану (CNBr) в окремих випадках є більш придатним, особливо коли протеоліз під дією ферментів не йде до кінця [7]. CNBr розщеплює білки за залишками метіоніну. При роботі з бромціаном слід мати на увазі, що він розкладається з утворенням дуже токсичних ціанідів, тому всі операції з ним, включаючи зважування й проведення реакцій, необхідно здійснювати у витяжній шафі.

Матеріали й реактиви

70 % мурашина кислота; 70 % трифтороцтова кислота (ТФО); CNBr.

Хід роботи

1. Розчиняють білок або пептид у 70 % мурашиній кислоті або ТФО. Остання є найліпшою при розщепленні зв'язків Мет-Три та Мет-Сер, але, з разом з тим, вона сприяє окисненню триптофану.

2. Додають 50–100-кратний надлишок (за кількістю молів) CNBr відносно метіоніну.

3. Проводять інкубацію в атмосфері N_2 у темряві за 20–25 °С при обережному перемішуванні упродовж 24 год.

4. Упарюють на роторному випарнику.

5. Додають воду й ліофілізують.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В.Ф. Биофизика мембран // Сорос. образов. журн. – 1996. – № 6.
2. Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран // Сорос. образов. журн. – 1998. – № 10.
3. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // Сорос. образов. журн. – 1997. – № 6.
4. Барсуков Л.И. Как собрать мембрану (Солюбилизация и реконструкция мембран) // Сорос. образов. журн. – 2004. – № 1.
5. Барсуков Л.И. Липосомы // Сорос. образов. журн. – 1998. – № 10.
6. Барышников А.Ю., Оборотов Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // Современ. онкология. – 2001. – Т. 3, № 2.
7. Биологические мембраны. Методы / Под ред. Дж.Б. Финдлея, У.Г. Эванза. – М., 1990. – 424 с.
8. Биохимическое исследование мембран / Под ред. Э. Мэдди. – М., 1979.
9. Биохимия мембран: Учеб. пос.: В 10 т. / Под ред. А.А. Болдырева. Кн. 5. З.П. Кометиани, М.Г. Векуа. Кинетика мембранных транспортных ферментов. – М., 1988.
10. Болдырев А.А. Активный транспорт Ca^{2+} и его роль в поддержании кальциевого гомеостаза клетки // Итоги науки и техники. – 1985. – Т. 17.
11. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов. – М., 1985.
12. Болдырев А.А. Регуляция активности мембранных ферментов // Сорос. образов. журн. – 1997. – Т. , № 6.
13. Болдырев А.А., Мельгунов В.И. Транспортные АТФазы // Итоги науки и техники. – 1985. – Т. 17.
14. Варпаховская И. Липосомальные формы лекарственных средств // Ремедиум. – 1999. – № 5.
15. Владимиров Ю.А. Кальциевые насосы живой клетки // Сорос.образов. журн. – 1998. – № 3.
16. Возможности оригинальной технологии микрокапсулирования биологически активных веществ / С.А. Чубатова, В.С. Тульский, С.К. Панюшин и др. // Intern. J. Immunorehabilitation. – 1999. – № 12.
17. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Горбунова О.В., Жила Н.О. Динамика активности ключевых ферментов метаболизма полигидроксibuтирата у *Ralstonia eutropha* // Прикл. биохимия и микробиология – 2004. – Т. 40, № 2.
18. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. – М., 1997.
19. Есырев О.В. Роль транспортных АТФаз в электромеханическом сопряжении мышц. – Алма-Ата, 1983.
20. Кагава Я. Биомембраны / Под ред. В.Е. Кагана. – М., 1985.
21. Карпушина И.А., Стеблева Т.Ф., Бонитенко Е.Ю. Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике // Токсикология. – 2004. – Т. 5, № 120.
22. Кобринский Г. Липосомы в медицине // Наука и жизнь. – 1988. – № 6.
23. Кравцов А.В., Алексеев И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. – К., 1990.
24. Курский М.Д., Кучеренко С.М. Биомембранология: Навч. посіб. – К., 1993.
25. Лиско В.К. Натриевый насос биологических мембран. – К., 1977.

26. Лишко В.К., Шевченко М.И. Мембраны и жизнь клетки. – К., 1987.
27. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. – М., 1986.
28. Осто М.Дж. Липосомы // В мире науки. – 1987. – № 3.
29. Повышение эффективности действия бифидумбактерий путем обработки их липосомами, нагруженными иммуномодулятором / В.Д. Потапов, С.А. Чубатова, В.П. Левчук и др. // 5-я Всерос. конф. "Научные основы технологии производства ветеринарных препаратов". – Щелково, 1996.
30. Посте Дж. Взаимодействие липидных везикул (липосом) с клетками в культуре и их использование как переносчиков лекарств и макромолекул // Липосомы в биологических системах. – М., 1988.
31. Применение фениламида цис-акотиновой кислоты в липосомальной форме для терапии Гермеса / И.Ю. Кучма, А.Ю. Волянский, В.Ф. Москаленко и др. // Журн. микробиологии. – 2000. – № 5.
32. Рингсдорф Г., Шмидт Б. Системы полимерных носителей лекарств // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. – 1987. – Т. 32, № 5.
33. Рыбальченко В.К., Коганов М.М. Структура и функции мембран: Практикум. – К., 1988.
34. Рыбальченко В.К., Курский М.Д. Молекулярная организация и ферментативная активность биологических мембран. – К., 1977.
35. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1987.
36. Тенденции в развитии исследований в области липосом: Обзор патентной литературы / Н.Ю. Несытова, Н.С. Палева, Е.В. Ильина и др. // Вест. АМН СССР. – 1990. – № 10.
37. Тихонов Н.Г., Перепелкин А.И. Лечение бронхопневмонии с/х животных липосомальным стрептомицином // Проблемы биологической и экологической безопасности: Матер. Междунар. науч.конф. (22– 24 мая 2000 г., Оболенск). – Оболенск, 2000.
38. Торчилин В.П., Клибанов А.Л. Липосомы как средства направленного транспорта лекарств // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. – 1987. – Т. 32, № 5.
39. Транспортные аденозинтрифосфатазы. Современные методы исследования. – М., 1977.
40. Фаворова О.О. Лечение генами – фантастика или реальность? // Сорос. образ. журн. – 1997. – № 2.
41. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. Направленный транспорт лекарств: проблемы и перспективы // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. – 1987. – № 5.
42. Чизмаджев Ю.А. Как сливаются биологические мембраны // Сорос. Образов. журн. – 2001. – т. 7, № 5.
43. Чизмаджев Ю.А. Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин // Сорос. Образ. Журн. – 2000. – т. 6, № 8.
44. Чубатова С.А., Дергунов А.Д., Капрельянц А.С., Перельгин В.В. Использование липосом с заключенной ДНК для трансформации сферопластов *E. coli* // Липосомы. Применение в биологии и медицине, – М.; 1985.
45. Чубатова С.А., Тульский В.С., Жуковский Ю.Г., Жуковская В.А. / Активные ингредиенты и система их доставки в косметических средствах репарировющего действия // Эксперим. и клини. дерматокосметология. – 2004. – № 1.

46. Abeywardena M.Y., Charnock J.S. Modulation of cardiac glycoside inhibition of (Na⁺ + K⁺)-ATPase by membrane lipids: differences between species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 729.
47. Alien T.M., Brandeis E., Hansen C.B. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1237.
48. Amende L.M., Donlon M.A. Large amounts of membranes enriched either in perigranular membranes or in plasma membranes have been successfully isolated from rat peritoneal mast cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 812.
49. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. II. Preparation and composition of the microsomal fraction / A. Amar-Costesec, H. Beaufay, M. Wibo, et. al. // *J. Cell. Biol.* – 1974. – Vol. 61.
50. Anholt R., Lindstrom J., Montal M. Stabilization of acetylcholine receptor channels by lipids in cholera solution and during reconstitution in vesicles // *J. Biol. Chem.* – 1981. – Vol. 256.
51. Anner B.M., Imesch E., Moosmayer M. Normal sensitivity of Na⁺/K⁺-ATPase isolated from brain and kidney of spontaneously hypertensive rats to sodium, ouabain or mercury // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1270, № 1.
52. Anner B.M. Interaction of Na⁺, K⁺-ATPase with artificial membranes. I. Formation and structure of Na⁺, K⁺-ATPase-liposomes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 822.
53. Bangham A.D. Liposomes: the Babraham connection // *Chem. Phys. Lipids.* – 1993. – Vol. 64, № 1-3.
54. Bangham A.D., Home R.W. Negative Staining of Phospholipids and their Structured Modification by Surface Agents as Observed in the Electron Microscope // *J. Molec. Biol.* – 1964. – Vol. 8.
55. Bartolommei G., Buoninsegni F.T., Moncelli M.R. Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase can be investigated on a solid-supported membrane // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – Vol. 63, № 1-2.
56. Beddow J.A., Peterson I.R., Heptinstall J., Walton D.J. Reconstitution of nicotinic acetylcholine receptors into gel-protected lipid membranes // *Anal. Chem.* – 2004. – Vol. 76, № 8.
57. Benallal M., Anner B.M. Major organ-specific glycoproteins in isolated brain and kidney membranes identified as Na,K-ATPase subunits by combined glycan-, lectin-, and immunoblotting // *Biosci. Rep.* – 1995. – Vol. 15, № 1.
58. Bhairi S.M. Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. – New York, 2001.
59. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1968. – Vol. 21.
60. Chaize B., Colletier J.P., Winterhalter M., Fournier D. Encapsulation of enzymes in liposomes: high encapsulation efficiency and control of substrate permeability // *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 32, № 1.
61. Chattopadhyay A., Harikumar K.G. Dependence of critical micelle concentration of a zwitterionic detergent on ionic strength: implications in receptor solubilization // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 391, № 1-2.
62. Croze E.M., Morre D.J. Isolation of plasma membrane, golgi apparatus, and endoplasmic reticulum fractions from single homogenates of mouse liver // *J. Cell. Physiol.* – 1984. – Vol. 119.

63. Donnell M.E., DeLuca G.M., Blackall D.P. Preparation and characterization of fluorescein-labeled plasma membrane vesicles from transfected Chinese hamster ovary cells // *J. Immunol. Methods.* – 1995. – Vol. 187, № 1.
64. Fenske D.B., Cullis P.R. Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 391.
65. Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., Lazarow P.B. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum // *J. Cell. Biol.* – 1982. – Vol. 93.
66. Gabriel N.E., Roberts M.F. Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles // *Biochemistry.* – 1984. – Vol. 23.
67. Gaines G.L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. – New York, 1966.
68. Goormaghtigh J., Scarborough G.A. Density-based separation of liposomes by glycerol gradient centrifugation // *Analytical Biochemistry.* – 1986. – Vol. 159.
69. Henning R, Plattner H. Isolation of rat liver lysosomes by loading with colloidal gold // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol. 354, № 1.
70. Hidalgo C. Lipid-protein interactions and the function of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum // *CRC Critical Rev. in Biochemistry.* – 1987. – Vol. 21.
71. Hjelmeland L.M. Solubilization of native membrane proteins // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 182.
72. Huang C., Mason J.T. geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1978. – Vol. 75.
73. Incorporation of acetylcholine receptors into liposomes. Vesicle structure and acetylcholine receptor function / R. Anholt, D.R. Fredkin, T. Deerinck, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257, № 12.
74. Ivanov A.V., Modyanov N.N., Askari A. Role of the self-association of beta subunits in the oligomeric structure of Na⁺/K⁺-ATPase // *Biochem. J.* – 2002. – Vol. 364, pt 1.
75. Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions // *Annu. Rev. Physiol.* – 2003. – Vol. 65.
76. Jorgensen P.L., Pedersen P.A. Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in Na,K-ATPase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1505, № 1.
77. Kaufmann S.H., Gibson W., Shaper J.H. Characterization of the major polypeptides of the rat liver nuclear envelope // *J. Biol. Chem.* – 1983. – Vol. 258, № 4.
78. Knol J., Sjollem K., Poolman B. Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37, № 46.
79. Koland J.G., Miller M.J., Gennis R.B. Reconstitution of the membrane-bound, ubiquinone-dependent pyruvate oxidase respiratory chain of *E. coli* with the cytochrome d terminal oxidase // *Biochemistry.* – 1984. – Vol. 101.
80. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, №1.
81. Maire M. le, Champeil P., Moller J.V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1508, № 1-2.
82. Marcantonio E.E., Amar-Costesec A., Kreibich G. Segregation of the polypeptide translocation apparatus to regions of the endoplasmic reticulum containing ribophorins and ribosomes. II. Rat liver microsomal subfractions contain equimolar amounts of ribophorins and ribosomes // *J. Cell. Biol.* – 1984. – Vol. 99, № 6.
83. Medina O.P., Zhu Y., Kairemo K. Targeted liposomal drug delivery in cancer // *Curr. Pharm. Des.* – 2004. – Vol. 10, № 24.

84. Molloy M.P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients // *Anal. Biochem.* – 2000. – Vol. 280, № 1.
85. Neugebauer J.M. Detergents: an overview // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 182.
86. Neville D.M., Jr. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1960. – Vol. 8.
87. Ostro M.J. Liposomes // *Sci. Am.* – 1987. – Vol. 256, № 1.
88. Ozols J. Preparation of membrane fractions // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 182.
89. Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications / M. Merricad, J.C. Domingo, J. Petriz et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1509.
90. Price M.R., Harris J.R., Baldwin R.W. Method for the isolation and purification of normal rat liver and hepatoma nuclear "ghosts" by zonal centrifugation // *J. Ultrastruct. Res.* – 1972. – Vol. 40.
91. Rapid and large-scale isolation of microsomal fraction of mouse liver by lyophilization and low speed centrifugation / N. Iwata, T. Mukai, S. Hara et al. // *Tohoku J Exp Med.* – 1996. – vol. 180, № 1.
92. Rasmussen U.F., Rasmussen H.N. Human quadriceps muscle mitochondria: a functional characterization // *Mol. Cell. Biochem.* – 2000. – Vol. 208, № 1-2.
93. Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion / N. Kahya, E.I. Pecheur, W.P. Boei de et al. // *Biophys. J.* – 2001. – Vol. 81, № 3.
94. Regulation of calcium channel activity by lipid domain formation in planar lipid bilayers B. Cannon, M. Hermansson, S. Gyorke, et al. // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85, № 2.
95. Resistance of cell membranes to different detergents / S. Schuck, M. Honsho, K. Ekroos et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, № 10.
96. Revealing of proteins interacting with Na,K-ATPase / O.A. Akimova, N.V. Dolgova, N.V. Mast et al. // *Biochemistry. (Mosc).* – 2003. – Vol. 68, № 9.
97. Saito A., Wang C.T., Fleischer S. Membrane asymmetry and enhanced ultrastructural detail of sarcoplasmic reticulum revealed with use of tannic acid // *J. Cell Biol.* – 1978. – Vol. 79.
98. Seto-Young B., Chen C.-C., Wilson T. H. Reconstitution of the voltage-sensitive sodium channel of rat brain from solubilized components // *J. Membr. Biol.* – 1985. – Vol. 84.
99. Time-resolved charge translocation by sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase measured on a solid supported membrane / F.T. Buoninsegni, G. Bartolommei, M.R. Moncelli et al. // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 86, № 6.
100. Van der Steen A.T.M., Taraschi T.F., Voorhout W.P., De Kruijff B. Barrier properties of glycophorin-phospholipid systems prepared by different methods // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 733.
101. Vectorially oriented monolayers of detergent-solubilized Ca(2+) -ATPase from sarcoplasmic reticulum / L.A. Prokop, R.M. Stogin, A.B. Smith et al. // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 70, № 5.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	5
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРИ КЛІТИННИХ МЕМБРАН І МЕТОДИ ЇХ ВИВЧЕННЯ	7
1. Загальна характеристика структури біологічних мембран	7
2. Мембранна ензимологія	14
2.1. Типи мембранних ферментів.....	14
2.2. Особливості активності мембранних ферментів.....	16
2.3. Маркерні ферменти біомембран.....	19
2.3.1. Na^+ , K^+ -АТФаза плазматичних мембран.....	22
2.3.2. Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулума.....	26
2.4. Очищення мембранних білків.....	33
2.4.1. Солюбілізація мембранних білків.....	34
2.4.2. Хроматографічне розділення мембранних білків.....	56
2.4.3. Очищення мембранних білків на імуносорбентах.....	64
2.4.4. Розділення мембранних білків методом електрофорезу.....	64
2.4.5. Аналіз мембранних білків.....	69
2.5. Реконструкція мембранних білків.....	71
2.6. Вплив ліпідів на активність мембранозв'язаних ферментів.....	88
3. Методи виділення клітинних мембран	96
3.1. Методи руйнування клітин і тканин.....	96
3.2. Розділення субклітинних компонентів.....	97
3.3. Виділення різних клітинних органел.....	100
3.3.1. Виділення ядер та ядерних мембран.....	101
3.3.2. Виділення мітохондрій.....	102
3.3.3. Виділення лізосом.....	104
3.3.4. Виділення ендоплазматичного ретикулума.....	104
3.3.5. Виділення апарату Гольджі.....	106
3.3.6. Виділення плазматичних мембран.....	106
4. Модельні мембранні системи	110
4.1. Моношари на межі розділу фаз повітря – вода.....	111
4.2. Моношари на твердій основі.....	112
4.3. Плоскі бішарові мембрани.....	112
4.3.1. Отримання плоских бішарових мембран.....	112
4.3.2. Електричні властивості ліпідних бішарів.....	115
4.3.3. Іонний транспорт через мембранні бішари.....	117
4.4. Плоскі бішарові мембрани на твердій основі.....	118

4.5. Ліпосоми	118
4.5.1. Механізм утворення ліпосом	119
4.5.2. Властивості ліпосом	122
4.5.3. Методи отримання ліпосом	123
4.5.4. Використання ліпосом	128
РОЗДІЛ 2. ОСНОВНІ МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН	139
1. Виділення клітин з різних органів	139
1.1. Виділення лімфоїдних клітин з тимусу й селезінки щурів [59]	139
1.2. Виділення ізольованих гладеньких м'язевих клітин [33]	140
2. Визначення цілісності клітинної мембрани [33]	141
3. Руйнування клітинної мембрани ультразвуком [33]	142
4. Виділення різних субклітинних фракцій	142
4.1. Виділення плазматичних мембран	142
4.1.1. Виділення плазматичних мембран з клітин гладеньких м'язів [33]	142
4.1.2. Виділення плазматичних мембран з печінки мишей	143
4.2. Методи виділення мітохондрій	145
4.2.1. Виділення мітохондрій з печінки щурів	145
4.2.2. Виділення мітохондрій з кори надниркових залоз бика	146
4.3. Методи виділення ядер	147
4.3.1. Виділення й очищення ядерних оболонок з печінки щурів за методом Харріса	147
4.3.2. Виділення ядерних оболонок з печінки щурів за методом Кауфманн	150
4.4. Отримання мембран апарату Гольджі з печінки щурів	151
4.5. Виділення мікосом з печінки щурів [8]	152
4.6. Виділення лізосом з печінки щурів	154
4.7. Отримання синаптосом з мозку щурів	155
4.7.1. Метод диференційного отримання синаптосом у кутовому роторі	155
4.7.2. Прискорений метод виділення синаптосом у градієнті густини фікол-сахароза	156
4.7.3. Прискорений метод отримання диференційованих синаптосом у градієнті густини сахарози в бакет-роторі	156
4.8. Отримання фрагментів саркоплазматичного ретикулума	157
5. Визначення концентрації білка в мембранних препаратах за методом Лоурі	159
6. Ідентифікація та оцінка чистоти субклітинних фракцій шляхом визначення активності маркерних ферментів	162
6.1. Визначення кількості неорганічного фосфору за методом Фіске–Суббароу	162

6.2. Визначення активності маркерних ферментів плазматичних мембран	163
6.2.1. Визначення активності $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -АТФази	163
6.2.2. Визначення активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФази	165
6.2.3. Визначення активності 5'-нуклеотидази	166
6.2.4. Визначення активності лужної фосфатази	166
6.3. Визначення активності маркерних ферментів мікосом	168
6.3.1. Визначення активності глюкозо-6-фосфатази	168
6.3.2. Визначення активності НАД _Н -дегідрогенази	169
6.3.3. Визначення активності Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулула	169
6.4. Визначення активності маркерних ферментів мітохондрій	170
6.4.1. Визначення активності цитохромоксидази	170
6.4.2. Визначення активності сукцинатдегідрогенази	173
6.4.3. Визначення активності моноамінооксидази	175
7. Виділення мембранних препаратів транспортних АТФаз з різних джерел	177
7.1. Отримання мембранних препаратів Na^+, K^+ -АТФази із скелетних м'язів кроля	177
7.2. Отримання препаратів Na^+, K^+ -АТФази з нирок морської свинки [39]	179
7.3. Отримання стабільних препаратів Na^+, K^+ -АТФази з мозку бика	181
7.4. Отримання очищених серцевих мікосом і гомогенної Ca^{2+} -АТФази	184
8. Виділення мембранних білків	191
8.1. Солюбілізація й очищення нікотинового ацетилхолінового рецептора з електричного органа ската (<i>Torpedo californica</i>)	191
8.1.1. Виділення мембран з електричного органа ската <i>Torpedo californica</i>	192
8.1.2. Солюбілізація й очищення нікотинового ацетилхолінового рецептора зі ската <i>Torpedo californica</i>	193
8.1.3. Підготовка колонки для очищення ацетилхолінового рецептора за допомогою афінної хроматографії	194
8.1.4. Аналіз на сульфгідрильні групи	195
8.2. Розділення периферичних та інтегральних білків мембран у двофазній системі	195
8.3. Проведення солюбілізації й отримання білкової фракції плазматичних мембран гладеньких м'язів [33]	196
8.4. Розділення білкової фракції плазматичних мембран гладеньких м'язів кроля методом електрофорезу на пластинках 5 % ПААГ [33]	197
8.5. Електроелекція білка з поліакриламідного гелю після електрофорезу у присутності SDS [7]	199
8.6. Аналіз мембранних білків методом електрофорезу із зсувом заряду	200
8.7. Розщеплення білка за допомогою бромціану	201
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	203

Навчальне видання

ОСТАПЧЕНКО Людмила Іванівна
МИХАЙЛИК Ірина Володимирівна

БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ: МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ

Навчальтереотипнений посібник

Редактор *Н. Витвицька*

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"



Підписано до друку 28.08.06. Формат 60x84^{1/16}. Вид. № 14. Гарнітура Arial. Папір офсетний.
Друк офсетний. Наклад 100. Ум. друк. арк. 12,32. Обл.-вид. арк. 15,1. Зам. № 26-3556.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43,
☎ (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; тел./факс (38044) 239 31 28.
E-mail: vydav_polygraph@univ.kiev.ua
WWW: <http://vpc.univ.kiev.ua>

Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02.