

VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOCHEMIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Lida Bagdonienė, Vida Bendikičienė,
Jurgis Kadziauskas, Danutė Labeikytė,
Arvydas Markuckas, Virginija Sabaliauskienė,
Zofija Sasnauskienė, Vaida Šeputienė

BIOCHEMIJOS
laboratoriniai darbai

VILNIAUS UNIVERSITETO LEIDYKLA
2006

Turinys

1. SAUGAUS DARBO BIOCHEMIJOS LABORATORIJOJE
PAGRINDINĖS TAISYKLĖS
 - 1.1. Bendrosios taisyklės
 - 1.2. Pagrindinės taisyklės
 - 1.3. Higienos reikalavimai
 - 1.4. Saugos priemonės
 - 1.5. Laboratorijoje naudojami sveikatai kenksmingi reagentai ir darbo ypatumai
 - 1.6. Pirmoji pagalba nelaimingų atsitikimų atveju
2. TIRPALAI IR JŲ RUOŠIMAS
 - 2.1. Tirpalų koncentracijos reiškimo būdai
 - 2.2. Tirpalų ruošimas, darbas su tirpalais
 - 2.3. Tirpalų tūrio matavimo priemonės
 - 2.4. Darbas automatiniu dozatoriumi
 - 2.4.1 *Automatinio dozatoriaus darbo tikslumo įvertinimas*
3. TIRPALŲ PH. BUFERINIAI TIRPALAI
 - 3.1. Vandenilio jonų koncentracijos reiškimas
 - 3.2. Vandenilio jonų koncentracijos matavimas
 - 3.3. Silpnų rūgščių ir bazių jonizacija
 - 3.4. Buferiniai tirpalai
 - 3.5. Buferinių tirpalų ruošimas
 - 3.5.1. *Buferinio tirpalo gaminimas, buferinės tirpalų talpos nustatymas*
4. AUDINIŲ IR LAŠTELIŲ ARDYMAS IR FRAKCIIONAVIMAS
 - 4.1. Laštelių ir audinių suardymas.
 - 4.2. Laštelių ir audinių suardymas, nenaudojant detergentu.
 - 4.3. Laštelių ir audinių ardymas, naudojant detergentus
 - 4.4. Homogenizacijos tirpalo sudedamosios dalys
 - 4.5. Laštelių ir/ar audinių frakcionavimo būdai. Centrifugavimas.
 - 4.5.1. *Diferencinis centrifugavimas*
 - 4.5.2. *Centrifugavimas tankio gradientu*

- 4.6. Nelastelinio ekstrakto frakcionavimo metodai
 - 4.6.1. *Balymų nusodinimas trichloracto rūgštimi (TCA)*
 - 4.6.2. *Balymų nusodinimas amonio sulfatu*
 - 4.6.3. *Balymų nusodinimas etanoliu*
 - 4.6.4. *Balymų nusodinimas parūgštintu acetonu ir metanoliu*
 - 4.6.5. *Dializė*
- 4.7. Peramininimas
- 4.8. Alkoholio dehidrogenazės (ADH) išskyrimas iš kepimo mielių
 - 4.8.1. *Alkoholio dehidrogenazės gryninimas*
 - 4.8.2. *Balymo kiekio nustatymas frakcijose*
 - 4.8.3. *Fermento aktyvumo nustatymas*
5. ŠVIESOS SUGERTIS
 - 5.1. šviesos sugerties prigimtis
 - 5.2. Kiekybiniai matavimai. Bero ir Lamberto dėsnis
 - 5.3. Kokybinės aminorūgščių atpažinimo reakcijos.
 - 5.3.1. *Ninhidrino reakcija*
 - 5.3.2. *Reakcija su histidinu ir tirozinu (Paulio reakcija)*
 - 5.3.3. *Biureto reakcija peptidiniams ryšiams nustatyti*
 - 5.4. Kokybinės angliavandeniu nustatymo reakcijos
 - 5.4.1. *Selivanovo reakcija ketoheksozėms nustatyti*
 - 5.4.2. *Triomerio reakcija aldozėms nustatyti*
 - 5.5. Balymų kiekio nustatymas
 - 5.5.1. *Balymų koncentracijos nustatymas, matuojant ultravioletinės šviesos sugertį ties 280 nm.*
 - 5.5.2. *Balymo kiekio nustatymas Louri metodu*
 - 5.5.3. *Balymo kiekio nustatymas bisinchoninės rūgšties (BCA) metodu*
 - 5.5.4. *Balymų kiekio nustatymas biureto metodu*
6. BALTYMŲ IR PEPTIDŲ MERKAPTOGRUPIŲ NUSTATYMAS
7. CHROMATOGRAFIJA
 - 7.1 Chromatografijos pasiskirstymo koeficientas
 - 7.2 Chromatografijos būdai
 - 7.3 Kolonėlinė chromatografija
 - 7.3.1. *Kolonėlinės chromatografijos įranga*
 - 7.3.2. *Nuostovioji fazė – užpildas/ sorbentas/nešiklis*
 - 7.3.3. *Kolonėlės paruošimas ir eliucija*

- 7.4. Plokšcioji (popieriaus ir plonasluoksnė) chromatografija
 - 7.4.1. *Popieriaus chromatografija*
 - 7.4.2. *Plonasluoksnė chromatografija*
- 7.5 Chromatografijos metodai
 - 7.5.1. *Adsorbcinė chromatografija*
 - 7.5.2. *Pasiskirstymo chromatografija*
 - 7.5.3. *Jonų mainų chromatografija*
 - 7.5.4. *Molekulių išskyrimo chromatografija (gelchromatografija)*
 - 7.5.5. *Giminingumo (afininė) chromatografija*
- 7.6. Aminorūgščių ir nukleotidų nustatymas
 - 7.6.1. *Plonasluoksnė chromatografija*
 - 7.6.2. *Ratinė popieriaus chromatografija*
 - 7.6.3. *Kylamoji chromatografija*
- 7.7. Mélynojo dekstrano nudruskinimas gelchromatografijos metodu
 - 7.7.1. *Kolonélės pildymas*
 - 7.7.2. *Pavyzdžio paruošimas ir užpylimas ant kolonélės*
- 7.8. Hemoglobino molekulinės masės nustatymas gelchromatografijos būdu
 - 7.8.1 *Sefadekso G-75-kolonélės V_o nustatymas*
 - 7.8.2 *Sefadekso G-75-kolonélės V_e nustatymas*
- 8. BALTYMŲ ELEKTROFOREZĖ
 - 8.1. Elektra ir elektroforezė
 - 8.2. Omo dėsnis ir elektroforezė
 - 8.3. Vienkryptė stacioji nutrūkstamoji baltymų gelelektroforezė denatūravimo salygomis (atsižvelgiant į Lemli)
 - 8.3.1. *Poliakrilamido gelio paruošimas*
 - 8.3.2. *Baltymų paruošimas elektroforezei ir jų išpilimas į koncentruojamojo gelio šulinėlius*
 - 8.3.3. *Elektroforezės aparato įjungimas į elektros srovės šaltinį*
 - 8.3.4. *Elektroforezės aparato išrinkimas po elektroforezės*
 - 8.3.5. *Baltymų dažymas gelyje*
 - 8.4. Baltymų nustatymas gelio elektroforezės metodu
 - 8.4.1. *Skiriamojo gelio paruošimas*
 - 8.4.2. *Koncentruojamojo gelio paruošimas*
 - 8.4.3. *Baltymų preparatų paruošimas elektroforezei ir jų išpilimas į koncentruojamojo gelio šulinėlius*
 - 8.4.4. *Baltymų dažymas gelyje po elektroforezės*

9. NUKLEORŪGŠČIU GRYNINIMAS IR ANALIZĖ
 - 9.1. DNR gryninimas
 - 9.2. RNR gryninimas
 - 9.3. DNR modifikuojantys fermentai
 - 9.1.1. *Restrikcijos endonukleazės*
 - 9.1.2. *DNR polimerazės*
 - 9.1.3. *Nukleazės*
 - 9.1.4. *DNR ligazės*
 - 9.1.5. *Fosfatazės ir kinazės*
 - 9.4. Nukleorūgščių elektroforezė agaroziniame gelyje
 - 9.5. Plazmidinės DNR gryninimas ir analizė
 - 9.5.1. *Plazmidinės pTZ19R DNR gryninimas*
 - 9.5.2. *Fermentinė pTZ19R DNR analizė*
 - 9.5.3. *1% agarozinio gelio paruošimas.*
 - 9.5.4. *Fermentinių reakcijų produktų analizė agaroziniame gelyje.*
 - 9.6. Bakterijų RNR gryninimas ir analizė
 - 9.6.1. *Bakterijų RNR gryninimas*
 - 9.6.2. *Bakterinės RNR fermentinė analizė*
 - 9.6.3. *Formaldehidinio 1,5% agarozės gelio paruošimas*
 - 9.6.4. *RNR analizė agaroziniame gelyje denatūravimo sąlygomis*
 - 9.7. Nukleoproteinų iš mielių išskyrimas ir analizė
 - 9.7.1. *Nukleoproteinų išskyrimas.*
 - 9.7.2. *Nukleoproteininio komplekso nukleorūgščių analizė*
 - 9.7.3. *Nukleoproteinų komplekso peptidų analizė*
 - 9.8. Chromosominės DNR išskyrimas iš eukariotinių lastelių
- A. TRIACILGLICEROLIŲ HIDROLIZĖ
10. PRADINIO FERMENTINĖS REAKCIJOS GREIČIO NUSTATYMAS
 - 10.1. Fermentai – biologiniai katalizatoriai
 - 10.2. Katalizės samprata
 - 10.2.1. *Fermentų struktūra ir veikimo ypatumai*
 - 10.3. Fermentinių reakcijų greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos
 - 10.4. Alkoholio dehidrogenazės katalizuojamos reakcijos pradinio reakcijos greičio nustatymas
 - 10.4.1. *Pradinio reakcijos greičio priklausomumo nuo fermento kieko nustatymas*
 - 10.4.2. *Pradinio reakcijos greičio priklausomumas nuo etanolio koncentracijos*

10.5. Šarminės fosfatazės iš E. coli pradinio reakcijos greičio nustatymas 134

 10.5.1. Pradinio reakcijos greičio priklausomumo

 nuo fermento kiekio nustatymas

 10.5.2. Pradinio reakcijos greičio priklausomumo nuo p-NPP

 koncentracijos nustatymas

11. PRIEDAI

— |

| —

— |

| —

1. Saugaus darbo biochemijos laboratorijoje pagrindinės taisyklės

1.1. Bendrosios taisyklės

- Prieš pradedant dirbti biochemijos laboratorijoje, susipažintama su saugaus darbo su cheminėmis medžiagomis, laboratoriniai prietaisai, darbo su mikroorganizmais ir bandomaisiais gyvūnais taisyklėmis.
- Darbo saugumas priklauso nuo žmogaus, dirbančio laboratorijoje, **asmeninės atsakomybės**.

Studentai, supažindinti su saugaus darbo taisyklėmis, pasirašo **Darbo saugos žurnale**.

- Prieš pradėdami dirbti, studentai **turi pasakyti dėstytojui apie tam tikrus sveikatos sutrikimus**, (pvz. alergiją, astmą). Ligos gali paumeti, atliekant laboratorijoje tam tikrus bandymus.

2. Pagrindinės taisyklės

- Laboratorijoje nedirbkite darbų, tiesiogiai nesusijusių su atliekama užduotimi. Prieš pradėdami bandymus, būtinai išsiaiškinkite darbo atlikimo metodiką ir pradēkite darbą tik dėstytojui leidus.
- Nenaudokite cheminių reagentų, ant kurių pakuočių nėra etikečių. Darbo vietoje turi būti tik konkrečiai užduočiai atlikti reikalingi reagentai ir prietaisai.
- Centrifuguokite tik sulygsvartintus mėgintuvėlius (rotoriuje vienas prieš kitą dedami lygaus svorio mėgintuvėliai) ir uždarę centrifugos dangtį.
- Nepalikite be priežiūros degančio dujų degiklio ir veikiančių prietaisų.
- Atsargiai dirbkite elektroforezės (baltymų ir nukleorūgščių) aparatais. Ijungti į elektros tinklą galima tik uždengus dangtį; elektroforezės metu nepilkite buferinio tirpalio ir nelieskite.
- Negalima siurbti skysčio į pipetę burna, reikia naudoti gumines kriausės arba specialius pipečių antgalius.
- Visada naudokite mažiausią kiekį medžiagos.
- **Draudžiama** pilti į kriaukles cheminių reagentų ir **organinių tirpiklių** atliekas, mikroorganizmams auginti panaudotos mitybinės terpės liekanas. Į šiuokšlių dėžę negalima išmesti naudotą agarozės ir poliakrilamido gelį, Petri lėkštelių su bakterijų kolonijomis. Šios atliekos pilamos arba sudedamos į tam skirtus konteinerius.

3. Higienos reikalavimai

- Paltus ir striukes palikite drabužinėje, o rankines, kuprines tvarkingai sudėkite tam skirtoje vietoje. Pageidautina, kad apsivilktumėte laboratorinį chalatą o ilgus plaukus surištumėte.
- Laboratorijoje draudžiama valgyti, gerti, rūkyti. Negalima uostytį arba ragauti jokių cheminių medžiagų. **Prisiminkite, kad beveik visos cheminės medžiagos yra nuodingos!**
- Dirbtį su ypač kenksmingomis ir skleidžiančiomis nemalonų kvapą medžiagomis (pvz., fenoliu, chloroformu) reikia traukos spintoje ir būtinai užsimovus pirštines.
- Darbus, kurių metu gali būti pažeistos akys, reikia atlirkti su apsauginiais akiniais ar kaukėmis.

4. Saugos priemonės

- Visada prisiminkite, kad **koncentruotos rūgštys**, jas skiedžiant, **visada** pilamos į vandenį, o ne atvirkščiai!
- Būkite atsargūs dirbdami su organiniais tirpikliais: beveik visi yra degūs. Jų negalima kaitinti atvira liepsna, nes kilus gaisrui sunku užgesinti. Be to, tirpikliai yra lakūs ir nuodingi.
- Laboratorijose naudojami stikliniai cheminiai indai, todėl reikia dirbtį atsargiai, nes dūžtantys stiklai gali sužaloti. Nenaudokite įskilusių arba aplūzinėjusiai kraštais indų.
- Ypač atsargiai reikia naudoti stiklinius gyvsidabrio termometrus. Negalima termometrų naudoti vietoje stiklinės lazdelės reakcijos mišiniui maišyti. Sudužus termometriui ir išsipylyus gyvsidabriui, reikia nedelsiant pranešti laborantui arba dėstytojui. Gyvsidabrij būtina surinkti.
- Kaitinant arba virinant skysčius mėgintuvėliuose arba kolbose, jų angą reikia nukreipti nuo savęs ir šalia dirbančių kolegų, o indą judinti, kol skystis tolygiai išyla. Negalima žiūrėti į kaitinamo indo turinį iš viršaus. **Saugokite akis!**
- Neliesti elektros prietaisų šlapiomis rankomis.

5. Laboratorijoje naudojami sveikatai kenksmingi reagentai ir darbo ypatumai:

- **Akrilamidas** – neurotoksinas, patekės pro odą, kaupiasi organizme. Sverti reikia labai atsargiai, užsidėjus kaukę ir mūvint pirštines. Poliakrilamido geliai nėra pavojingi.
- **Aktinomicinas D** – antibiotikas, kancerogenas, gali sukelti alergiją. Sverti ir tirpinti tik užsimovus pirštines, saugoti akis.

- **Ditiotreitolis (DTT)** – neurotoksinas.
- **Etidžio bromidas** – mutagenas, nuodingas. Su tirpalais, turinčiais etidžio bromido, dirbtai tik mūvint pirštines.
- **Beta-merkaptoetanolis** – neurotoksinas. Šį reagentą pilstyti tik traukos spintoje. Šaltame kambarje reagentą reikia pilti labai atidžiai ir greitai (skleidžia nemalonų kvapą).
- **Fenolis** – labai agresyvus, graužia, gali sukelti sunkius nudegimus. Dirbtai tik mūvint pirštines ir su apsauginiais akiniais. Ikvėpus fenolio garų, gerti stiprią kavą arba arbata, kvėpuoti 2% sodos tirpalą.
- **NDS (natrio dodecilsulfatas)** – alergenas, sverti NDS tik užsidėjus kaukę ir užsimovus pirštines (labai lengvai dulka, pavojinga ikvėpti).
- **Trichloracto ir trifluoracto rūgštys** – agresyvios organinės rūgštys, dirbtai užsimovus pirštines ir su apsauginiais akiniais.

6. Pirmoji pagalba nelaimingų atsitikimų atveju

- Prireikus naudotis pirmosios medicininės pagalbos vaistinėle.
- Išipjovus ar susižeidus stiklo šukémis, atsargiai pašalinti iš žaizdos stiklo gabaliukus, o ijpautą vietą patepti spiritiniu jodo tirpalu ir apristi.
- Apsideginus, odą šaldyti vandeniu, vėliau pažeistą vietą plauti 5% kalio permanganato tirpalu ir patepti tepalu nuo nudegimo. Cheminių nudegimų atveju pažeistą vietą gerai nuplauti šalto vandens srove, o apsideginus rūgštims plauti 2% NaHCO₃ tirpalu. Patekus rūgštims į akis, taip pat skalauti 2% NaHCO₃ tirpalu, o vėliau labai atidžiai skalauti vandeniu. **Nedelsiant reikia kreiptis į gydytoją!**
- Nusideginus šarmais, pažeistą vietą skalauti tekančia vandens srove, o vėliau plauti 2% acto arba boro rūgšties tirpalu. Šarmai ypač pavojingi akinims. Patekus šarmams į akis, reikia vandens srove 5–10 min. plauti akį, vėliau skalauti 2% boro rūgšties tirpalu. **Nedelsiant reikia kreiptis į gydytoją !**
- Patekus ant odos fenoliui, trifluoracto, trichloracto rūgštims ar kitoms agresyvioms, medžiagoms, pažeistą vietą nuplauti 40% etanoliu, patepti tepalu nuo nudegimų ir apristi.

2. Tirpalai ir jų ruošimas

2.1. Tirpalų koncentracijos reiškimo būdai

Tirpalas yra homogeniška sistema, sudaryta iš **tirpiklio** (pvz., vandens) ir **tirpinio**. Tirpalų savybės priklauso nuo tirpiklio ir tirpinio santykio bei jų savybių. Labai dažnai reikia nustatyti **tirpalo koncentraciją**, t. y. paruošti tam tikros sudėties tirpalą arba nustatyti ištirpusios medžiagos kiekį tirpale. Remiantis SI sistema, ištirpusios medžiagos **koncentracija** reiškiama $\text{mol} \times \text{m}^{-3}$, dimensija m^{-3} . Tiesa, laboratorijoje šis koncentracijos reiškimo būdas naudojamas retai. Daugiau įprasta vartoti **nesisteminus koncentracijos reiškimo vienetus**.

2.1. lentelė. Nesisteminiai koncentracijos reiškimo būdai

Žymėjimas	Pavadinimas ir paaiškinimas
C_m	Molialinė koncentracija – tirpinio moliių kiekis 1000 g tirpiklio
C	Molinė koncentracija – tirpinio moliių kiekis viename litre tirpalo
C_N	Molinė ekvivalentų koncentracija – tirpinio ekvivalentų moliių kiekis viename litre tirpalo
T	Titas – tirpinio masė gramais, esanti 1 ml tirpalo
w	Masės dalis (w/w) – tirpinio ir tirpalo masių santykis
$w\%$	Masės dalies procentai (%w/w) – procentinė koncentracija – tirpinio masė gramais, esanti 100 g tirpalo

Dažniausiai tirpalo koncentracija reiškiama C , C_N ir w būdais.

Molinė koncentracija, C (mol l^{-1}) vartojoama bene dažniausiai, žymima paprastais skliaustais ir raide C (pvz., C(NaCl)) arba laužtiniais skliaustais (pvz.[NaCl]). **Molis** – bedimensis medžiagos kiekių matavimo vienetas. Tai medžiagos kiekis, kuriamo yra $6,022 \times 10^{23}$ (Avogadro konstanta) tos medžiagos molekulių. Sutarta kalbant apie medžiagos kiekį, žymėti „**mol**“ (bedimensis dydis). Rašant „**M**“, turima galvoje ne medžiagos kiekis, o koncentracija – molis/litre. „**M**“ dimensija – [l^{-1}]. Taigi $M = \text{mol/l}$. Naudotis molinės koncentracijos reiškimo būdu paprasta tik žinant tirpinio „**molinę masę**“, t. y. $6,03 \times 10^{23}$ tirpinio molekulių masę. Medžiagos molinė masė žymima „ M_m “ ir matuojama gramais. Kartais ji pateikiama kaip santykinė molinė masė „ M_r “ . „ M_r “ – bedimensis dydis, kurio skaitinė reikšmė lygi „ M_m “.

Pavyzdys. Koks kiekis ir kokia masė(m) KCl yra 5 ml 5M KCl tirpalui?

1 litre 5M KCl tirpalui yra ištirpusios 5 mol druskos, t. y. 1 ml – 5 mmol druskos. Tai yra 5 ml tirpalui yra ištirpusios $n = 5 \times 5 = 25$ mmol KCl druskos.

$$M_r(\text{KCl}) = 74,54. m(\text{KCl}) = n M_m = 0,025 \times 74,54 = 0,11\text{g}.$$

Molinė ekvivalentų koncentracija (ekv l^{-1}). Ištirpusios medžiagos ekvivalentų molių skaičius viename litre tirpalui. Ekvivalentų molio masė – elemento arba medžiagos masė gramais, skaitine reikšme lygi ekvivalentui. Rūgšties ekvivalentas skaitine reikšme lygus molinei rūgšties masei, padalytai iš vandenilio atomų skaičiaus rūgšties molekulėje, bazės – molinei bazės masei, padalytai iš metalo valentingumo, druskos – molinei druskos masei, padalytai iš metalo atomų saicius ir metalo valentingumo sandaugos.

Pavyzdys. Koks kiekis HCl ir H_2SO_4 yra 1ml šių rūgščių 1N tirpaluose?

HCl-vienprotonė rūgštis, HCl g-ekv= $M_m(\text{HCl})$. Taigi 1 litre tirpalui yra 1 molis HCl, o 1 ml 1N HCl tirpale yra 1 mmol HCl.

H_2SO_4 – dviprotonė rūgštis, H_2SO_4 g-ekv= $M_m(\text{H}_2\text{SO}_4)/2$. Taigi 1 litre tirpalui yra 0,5 molio H_2SO_4 , o 1 ml 1N H_2SO_4 tirpalui yra 0,5 mmol H_2SO_4 .

Masės dalies (procentiniai) tirpalai. Masės dalis gali būti išreikšta vieneto dalimis (**žymima w/w**) arba procentais (**žymima %w/w**):

$$w\% = \frac{m_{\text{tirpinio}}}{m_{\text{tirpalio}}} \times 100\%.$$

Čia w% – masės dalis (šiuo atveju procentais).

Tirpinio masės dalį išreikšti procentais daugiau išprasta nei vieneto dalimis. Procentai rodo, kiek dalijų sudaro tirpinys, jeigu visas tirpalas sudaro 100 dalijų.

Pavyzdys. Kiek grynos acto rūgštis yra 400 g tirpalui, kuriame acto rūgšties masės dalis yra 9%?

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = 9\% \times 400 \text{ g}/100\% = 36 \text{ g} \text{ t. y. grynos acto rūgštis} – 36 \text{ g.}$$

Norint paruošti 5% NaCl tirpalą, reikia 5 g druskos ištirpinti 95 g vandens. Galima pasverti 95 g vandens ir tirpinti druską arba paprasčiausiai 5 g druskos tirpinti 95 ml vandens (distiliuoto vandens tankis 1g/cm^3 , taigi $v = w$, čia v – vandens tūris, w – masė). Kartais 5% NaCl tirpalas ruošiamas kitaip – 5 g NaCl ištirpinama mažame vandens tūryje (pvz., ≈ 80 ml), o vėliau matavimo kolboje ar menzūroje tirpalui tūris papildomas iki 100 ml. Taip paruoštas tirpalas skiriasi nuo pirmuoju būdu pagaminto. Susitarta, kad pirmuoju būdu pagaminti tirpalai žymimi w/w, o antruoju būdu – %w/v. Tai yra tirpalai, kurių koncentracija išreikšta masės dalies procentais, atsižvelgiant į paruošimo būdą, turėtų būti žymimi %w/w arba %w/v. Kartais užrašas %v/v rodo skysto

tirpinio procentinę tūrio dalį. Taigi, jei ruošiate tirpalą, kurio koncentracija išreikšta tirpalo masės arba tūrio dalimis, **nurodykite w/w, w/v arba v/v** – t. y. paaiškinkite, kaip pagaminote tirpalą. Jei ant tirpalo etiketės nėra šių ženklų, dažniausiai daroma prilaida (ne visada teisinga), kad tirpalo koncentracija **%w/w**.

Pavyzdys. Kaip pagaminti 10% w/w akrilamido (100g) , 10% w/v sacharozės (100 ml) ir 10% v/v glicerolio (100 ml) tirpalus.

10% w/w akrilamido tirpalas ruošiamas 10 g akrilamido ištirpinus 90 g (90ml) vandens. 10% w/v sacharozės tirpalas ruošiamas 10 g sacharozės tirpinant vandenye, vėliau tirpalo tūris papildomas iki 100 ml. 10% v/v glicerolio tirpalas ruošiamas 10 ml glicerolio tūri praskiedžiant iki 100 ml.

Kartais naudojami kiti nesisteminiai (w/v) koncentracijos reiškimo būdai. **ppm** (angl. *parts per million*) – milijoninės dalys, **ppb** (angl. *parts per billion*) – milijardinės dalys. **ppm** ekvivalentiškas užrašui $\mu\text{g ml}^{-1}$ (10^{-6}g ml^{-1}), t. y. 1,0 ppm tirpalo koncentracija $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($1,0 \times 10^{-6}\text{g ml}^{-1}$). Analogiškai, **ppb** – milijardinė dalis, užrašas ekvivalentiškas ng ml^{-1} (10^{-9}g ml^{-1}), t.y 1,0 ppb tirpalo koncentracija ng ml^{-1} ($1,0 \times 10^{-9}\text{g ml}^{-1}$). Šie vienetai dažniausiai taikomi liepsnos fotometrijai, atominei absorbcinei spektroskopijai, dujų chromatografijai –apibūdinant labai praskiestus tirpalus.

Tirpalų skiedimas. Skiedžiant tirpalus, labai patogu atsiminti priklausomybę:

$[C_1]V_1=[C_2]V_2$; čia C_1 ir C_2 – pradinio ir galutinio (praskiesto) tirpalų koncentracijos, išreikštos tais pačiais vienetais, V_1 ir V_2 – šių tirpalų tūriai.

Pavyzdys. Kaip iš 0,5 M NaCl 200 ml tirpalo pagaminti 0,1M NaCl tirpalą?

$0,5\text{ M} \times 200\text{ ml} = 0,1\text{ M} \times V_2$; $V_2 = 1000\text{ ml}$. Tai yra reikia 200 ml 0,5 M NaCl tirpalą atskiesti iki 1000 ml, kad jo koncentracija būtų 0,1 M.

Pradiniai tirpalai (angl. *stock solutions*). Dažnai tirpalai gaminami iš koncentruotesnių tirpalų, juos **tinkamai praskiedžiant**. Tai patogu, nereikia kiekvieną kartą iš naujo ruošti tirpalų.

Pavyzdys. Atliekant PAGE-NDS elektroforezę, tiriami pavyzdžiai turi būti ištirpinti tirpale, vadinamame *baltymų denatūravimo (pavyzdžio) buferiu*. Pavyzdžio buferio sudėtis – 62,5 mM TRIS-HCl, pH 6,8; 2% NDS, 10% glicerolio, 5% β -merkaptoetanolio ir 0,001% bromfenolio mėlynojo. Praktiškai ruošiami $2 \times$, $3 \times$, ..., $6 \times$ koncentruotesni pavyzdžio buferiniai tirpalai, kuriuose **visų tirpalų sandū** (TRIS, NDS, glicerolio, β -merkaptoetanolio) koncentracija yra $2 \times$, $3 \times$, ..., $6 \times$ didesnė.

Kokių savybių pavyzdžio buferis turi būti sumaišytas su tiriamu mėginiu, jeigu vartosite 2 ×, 3 × ir 6 × koncentruotiesnius baltymų pavyzdžio buferinius tirpalus?

Naudojant 2 × pavyzdžio buferį sumaišoma 1:1 savybių, t. y. imama viena dalis pavyzdžio buferio ir viena dalis tiriamo tirpalio, naudojant 3 × buferį sumaišoma savybių 1:2 (imama viena dalis pavyzdžio buferio ir dvi dalys tiriamo mėginio), naudojant 6 × pavyzdžio buferį sumaišoma 1:5 savybių (imama viena dalis pavyzdžio buferio ir penkios dalys tiriamo tirpalio).

2.2 Tirpalų ruošimas, darbas su tirpalais

Ruošdami tirpalą, **pasidomėkite tirpinamos medžiagos savybėmis**. Neatsargiai dirbdami su tam tikromis medžiagomis, galite pakenkti sveikatai. Bendra taisyklė – visų medžiagų tirpalai potencialiai kenksmingi – dirbkite atidžiai ir susikaupę. Ruošdami tirpalus laikykite šių pagrindinių taisyklių:

- visų medžiagų tirpalus ruoškite iš turimų reagentų pasirinkę **geriausios kokybės**, švariausią reagentą;
- tirpalus gaminkite naudodami aukščiausios kokybės vandenį, patartina dukart distiliuotą ir dejonizuotą;
- esant galimybei, visi tirpalai sterilizuojami (autoklavuojama, jei tirpalio sandai stabilūs kaitinant arba filtruojama pro 0,22 mm filtrą).

Gaminant tirpalus, tenka **sverti** norimą reagento ar tirpiklio kiekį. Laboratorinės **svarstyklės** skiriasi savo **svérimo tikslumu** ir **svérimo riba**. Svarstyklės, kurių svérimo tikslumas 0,0001 g, svérimo riba – 60 g, naudojamos sverti mažiemis medžiagos kiekiams, dažniausiai **iki 100 mg**. Sveriant didesnius medžiagos kiekius, naudojamos svarstyklės, kurių svérimo tikslumas yra 0,001 g, svérimo riba 100 g. Retsykiais, kai reikia pasverti didesnius medžiagų kiekius kaip 100 g arba mažesnius kaip 0,0001 g, kreipkitės į laborantą ar dėstytoją.

Sveriant „X” g medžiagos reikia:

- padėti ant svarstyklės tuščią talpą, kurioje bus sveriamas reagentas.
- nustatyti „0”.
- mentele (švaria ir iškaitinta) įberti „X” g reagento.

Sunkumai sveriant :

- reagentas „susigulėjo”:
 - Užkimšus reagento butelį ir stipriai supurčius, kartais pavyksta pašalinti sunkumus.
 - Mentele (švaria ir iškaitinta) susmulkinamas susigulėjęs reagentas.

- reikia sverti lakias (NDS, bakterijų kultivavimo terpės) medžiagas.
 - Sverti traukos sąlygomis.
 - Sverti užsidėjus apsauginę kaukę.
- svérimo metu reagentas išbarstytas ant svarstyklių lékštelės.
 - **negalima bandyti surinkti reagento atgal į talpą.** Toks išbarstytas reagentas atsargiai nuémus svarstyklių lékštelę išmetamas. Svarstyklių lékštelė atsargiai nuvaloma. **Draudžiama** bandyti nupūsti išbarstytą reagentą. Tai užtikrintas būdas mažą problemą padaryti didžiule.

2.3. Tirpalų tūrio matavimo priemonės

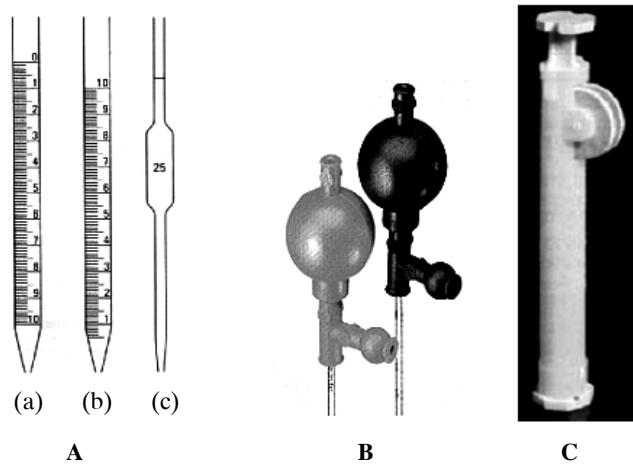
Dirbant su žinomos koncentracijos tirpalais, svarbu tiksliai pamatuoti **tirpalų tūri**. Tirpalų tūriui matuoti priemonės pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Laboratorijoje naudojamos tirpalų tūrio matavimo priemonės

Tūrio dozavimo priemonė	Tirpalo tūris, kurį galima dozuoti	Tikslumas	Ar tinkamai dozavimui, (+/-)
Kolba, stiklinė	25–5000 ml	Mažas	+
Matavimo cilindras	5–2000 ml	Vidutinis	+
Matavimo kolba	25–1000 ml	Labai didelis	+
Pipetė	1–100ml	Didelis	+
Automatinis tūrio dozatorius (pipetmanas) ¹	0,5–5000µl	Labai didelis	+
Švirkštas	0,5–20 ml	Vidutinis	+
Mikrošvirkštas	0,5–50µl	Labai didelis	+
Svērimas ^{2,3}	Bet koks	Labai didelis ³	-

- 1 – tikslumas labai didelis, jei dozuoti parinktas tinkamas prietaisas, taip pat jei jis tinkamai naudojamas
- 2 – žinant tirpalo tankį (medžiagų tankiai nesunkiai randami žinynuose ir/ar kataloguose), galima apskaičiuoti tirpalo tūri ($m = \rho \times V$, kur ρ – tirpalo tankis, m – tirpalo masė, V – tirpalo tūris)
- 3 – naudojant tinkamas svarstyklės

Laboratorijoje naudojamos 3 rūšių **pipetės**, pavaizduotos 2.1 pav. A. Atkreipkite dėmesį į a) ir b) skirtumus. Pipetės (a) tūrio gradavimas **nuo viršutinės žymės iki apatinės padalos**, pipetė (b) kalibruota **nuo apačios iki viršutinės žymės**. Skystis į pipetes įsiurbiamas **kriausėmis** ir **siurbliukais**. Venkite traukti burna – tai nesaugu. Siurbliukai gaminami kelių spalvų. **Geltonu** siurbliuku daugiausia galima įsiurbti 0,2 ml, **mėlynu** – 2 ml, **žaliu** – 10 ml, **raudonu** – 25 ml skysčio. Persuktas siurbliuko sraigtas yra dažniausia šių patogų įrankių lūžimo priežastis.



2.1 pav. Laboratorijoje skysčių tūriui paimti ir matuoti naudojami įrankiai.

A – pipetės: a) tūris graduojamas nuo pipetės viršaus, baigiasi apatine padala; b) serologinė pipetė – graduoti pradedama nuo pipetės apačios baigiamą viršutinę padala; c) nustatyto tūrio pipetė – tūri rodo pipetės žymę. B – skysčiui imti naudojamos kriausės ir C – siurbliukai.

Šiuo metu laboratorijose dažniausiai dirbant su vandeniniais tirpalais naudojami **automatiniai dozatoriai (pipetmanai)**.

Atsiminkite:

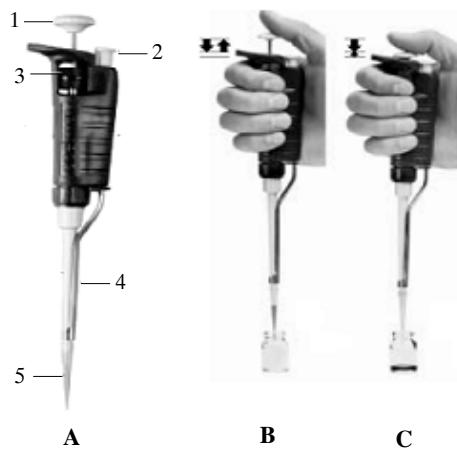
- ✓ su automatiniais dozatoriais **negalima** dozuoti koncentruotų rūgščių ir šarmų tirpalų;
- ✓ naudokite automatinius dozatorius, ant kurių yra uždėti **pakeičiamieji plastikiniai antgaliai**;
- ✓ visi dozatoriai turi **didžiausią leistiną dozuoti tūrį** (jis pažymėtas ant kiekvieno prietaiso korpuso). **Negalima**, reguliuojant dozatorių, **bandyti nustatyti** didesnį tūrį nei didžiausias leistinas (taip galima sulaužyti prietaisą);
- ✓ **mažiausias leistinas dozuoti tūris** ne visada būna pažymėtas ant prietaiso korpuso. **Negalima**, reguliuojant dozatorių, **bandyti nustatyti** mažesnį tūrį, nei leistinas mažiausias (jei jis nepažymėtas ant prietaiso korpuso – 10–20 % didžiausio leistino), nes taip galima sulaužyti prietaisą;
- ✓ įtraukę į prietaiso korpuso ertmę (ne į plastikinių antgalij) bet kurio skysčio, nedelsdami apie tai pasakykite laborantui ar dėstytojui;
- ✓ baigus darbą, automatiniai dozatoriai įstatomi į stovą.

2.3 lentelė. Automatiniai keičiamamo tūrio dozatoriai

Keičiamasis tūris, μl	Rekomenduojama dozuoti μl	Mažiausia padala, μl
0–2	0,1–2	0,002
0–10	0,5–10	0,02
0–20	2–20	0,02
0–100	10–100	0,2
0–200	50–200	0,2
0–1000	100–1000	2,0
0–5000	500–5000	2,0
0–10.000	1 ml–10 ml	20,0

2.4. Darbas automatiniu dozatoriumi

1. Parinkite tinkamą prietaisą tam tikram tūriui dozuoti. Dozatorių modeliai yra dviejų rūsių: **keičiamajo tūrio ir nekeičiamajo (fiksuoto) tūrio.** Fiksuoto tūrio dozatoriui galima paimti tik tam tikrą, ant prietaiso korpuso užrašytą tirpalą tūri. Ant visų keičiamajo tūrio prietaisų korpusų užrašytas didžiausias įsiurbiamo skysčio tūris. Keičiamajo tūrio dozatoriai yra keleto tipų (žr.lentelę 3): 2, 10 μl , 20 μl , 100 μl , 200 μl , 1000 μl , 5 ml ir 10 ml didžiausiems tūriams įsiurbti. Jeigu jums reikia įsiurbti, pvz. 67 μl , jūs galite naudoti 100 μl arba 200 μl keičiamajo tūrio dozatorius



2.2 pav. Automatiniai dozatoriai.

A– 1 – dozatoriaus stūmoklis; 2 – plastinio antgalio numetimo stūmoklis; 3 – sraigtas, kurį sukant nustatomos dozuojamas tūris; 4 – “rankovė” numetanti antgalis; 5– keičiamasis plastinius antgalis. B – dozatoriaus stūmoklio darbas įsiurbiant tam tikrą tūri; C – dozatoriaus stūmoklio darbas išplintant paimtą tirpalą

2. Sraigtu (2.2 pav., A) nustatykite norimą paimti tūri.
3. Užmaukite tinkamą plastikinį antgalį. Antgaliai yra plastikinėse dėžutėse, kartais yra svarbu, kad jie būtų sterilūs.
4. **Tirpalo įsiurbimas.** Laikydami dozatorių **staciai**, nuspauskite stūmoklį iki priesinimosi (2.2 pav., B– **pirmoji padėtis STOP**). Laikydami nykštį ant stūmoklio tokia padėtimi, plastikinį antgalį įmerkite į tirpalą. **Palengva** atleiskite pirštą nuo stūmoklio – tirpalas įtraukiamas į plastikinį antgalį. Palaukite keletą sekundžių – svarbu, kad nebūtų įtraukta oro burbuliukų. Ištraukite antgalį iš tirpalio. Dažniausia pradedančiųjų naudotis automatiniais dozatoriais **klaida** – per greitas stūmoklio atleidimas, tokiu būdu įtraukiama oro, netiksliai dozuojamas tirpalo tūris.
5. **Tirpalo išpylimas.** Antgalis priglaudžiamas prie indo, į kurį išpilamas dozuojamas tirpalas, sienelės 10–15° kampu nuo vertikalios padėties (žr. pav. 2.2. C). Stūmoklis nuspaudžiamas iki galo – **antrosios STOP padėties** (2.2 pav. C). Keletą sekundžių palaukiame, leidžiame visam skysčiui ištekėti iš plastikinio antgalio. Su nuspaustu iki galo stūmokliu (neatleidę piršto nuo stūmoklio), dozatorių išimame iš indo. Atleidžiame stūmoklį.
6. Antgalio nuėmimas. Daugelis dozatorių turi specialų stūmoklį antgaliams nuimti (2.2 pav. A). Tuo atveju paprasčiausiai nuspaudžiame šį stūmoklį ir pašaliname naudotą antgalį. Atsižvelgiant į naudotas medžiagas (nuodingos medžiagos, išprasti tirpalai) naudoti antgaliai surenka į atskirus konteinerius. Dozatoriaus neturinčio antgalij stūmoklio naudotą antgalį atsargai nuimame pirštais, laikydami už viršutinės antgalio dalies.
7. Dozatorių įstatome į stovą.

2.4.1. Automatinio dozatoriaus darbo tikslumo įvertinimas

Tikslas: Išmokti naudotis automatiniu dozatoriumi ir svarstyklėmis. Įvertinti dozavimo paklaidas.

Automatinio dozatoriaus darbo tikslumas įvertinamas gravimetrijos būdu. Paimami distiliuoto vandens mėginiai ir pasveriami. Distiliuoto vandens tankis 1 g/cm^3 , todėl $/v_i = /w_i$, kur v_i – i-tojo mėginio tūris, w_i – šio mėginio masė. Pasvérus kartotinai imamus mėginius, galima statistiškai įvertinti dozavimo paklaidas. Tikrosios matuojamo dydžio vertės įverčiu laikomas matavimo rezultatų aritmetinis vidurkis. Matavimai yra vienodo tikslumo, todėl **aritmetinis vidurkis** nustatomas taip:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n w_i}{n};$$

Čia n – matavimų skaičius, w_i – i-tojo matavimo metu gauta matuojamo dydžio vertė.

Absoliučioji paklaida (E):

$$E\% = \frac{|\mu - v_0|}{v_0} \times 100;$$

Čia v_0 – dozuojamas tūris, μ – aritmetinis vidurkis.

Santykinė matavimo rezultatų paklaida (E%):

$$E\% = \frac{|\mu - v_0|}{v_0} \times 100;$$

Standartinė paklaida:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (v_0 - w_i)^2}{n-1}}.$$

Apskaičiavę santykinę paklaidą, galime įvertinti prietaiso tikslumą – dozuojamo tūrio atitinkamą pasirinktą reikšmę. Standartinė paklaida rodo kartojimąsi, t. y. žmogaus, kuris atlieka dozavimo operaciją, atiduma.

Medžiagos ir prietaisai:

1. Automatiniai keičiamoji tūrio dozatoriai.
2. Svarstyklės.
3. Distiliuotas vanduo.

Darbo eiga:

1. Pasirenkamas tinkamas prietaisas dėstytojo pasiūlytam tūriui dozuoti.
2. Dozatoriumi paimti distiliuoto vandens mēginiai ($n \geq 5$) pasveriami. Sveriant vandens mēginius [2–10] ml naudoti svarstyklės, kurių tikslumas 0,0001 g, kitais atvejais – svarstyklės, kurių tikslumas – 0,001 g.
3. Apskaičiuojamas dozuojamo tūrio aritmetinis vidurkis, santykinė ir standartinė mēginių dozavimo paklaidos.

Kontroliniai klausimai.

1. Skiriant ribosomas iš kviečių daigelių, naudojamas tirpalas, kurio sudėtis : 90 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM Mg(CH₃COO)₂, 6 mM KHCO₃. Kaip paruošti 100 ml tokio tirpalą? Molinės masės (M_r) : 74,55 (KCl); 219 (CaCl₂×6H₂O); 214,46 (Mg(CH₃COO)₂×4H₂O); 100,1 (KHCO₃).
2. Įvertinkite automatinį dozatorių tikslumą. Trim dozatoriais (A, B ir C) buvo kartotinai imamas 1000 ml vandens bandinys. Šie bandiniai pasverti. Nustatyti

rezultatai (g). Kuris prietaisas geriausiai kalibruiotas. Kuriuo atveju studentas dozuodamas darė daugiausia klaidų?

- a. 0,986; 0,971; 0,993; 0,964; 0,983; 0,996; 0,977; 0,969; 0,982; 0,974;
- b. 1,013; 1,011; 1,010; 1,009; 1,011; 1,010; 1,011; 1,009; 1,011; 1,012;
- c. 0,985; 1,022; 1,051; 1,067; 0,973; 0,982; 0,894; 1,045; 1,062; 0,928.

1. Praktikuokite paruošti tirpalus iš koncentruotų pradinių (stock) tirpalų. Tarkime, jūs turite šiuos pradinius tirpalus : 0,1 M NaCl, 0,2 M KCl, 0,16 M CaCl₂; 0,005 M gliukozė. Kaip paruošti tirpalus, kurių sudėtis:
- a. 1ml 0,001 M KCl tirpalo;
 - b. 50 ml 0,0025 M NaCl ir 0,0005 M gliukozės tirpalo ;
 - c. 100 ml 0,005M NaCl; 0,0025 M KCl; 0,040 M CaCl₂; 0,0025 M gliukozė;
 - d. 10 ml tirpalo, kuriame NaCl, KCl ir CaCl₂ būtų po 20,0 mmol ml⁻¹;
 - e. 25 ml tirpalo, kuriame CaCl₂ būtų 0,008 M, KCl – 0,05 M, gliukozės – 20,0 nmol ml⁻¹.

Literatūra:

1. <http://www.chemnetbase.com>
2. Boyer R. (2000) Modern Experimental Biochemistry, 3rd edn, Benjamin Cummings, San Francisco.

3. Tirpalų pH. Buferiniai tirpalai

3.1. Vandenilio jonų koncentracijos reiškimas

pH yra neigiamas dešimtainis vandenilio jonų koncentracijos logaritmas.

$$\text{pH} = -\log_{10} C(\text{H}^+), \text{ arba}$$

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+].$$

Nuo pH priklauso visos biologinės sistemos aktyvumas, daugelio biomolekulių tirpumas. Gyvų organizmų vidinių skystių pH beveik nekinta. Tai sudaro palankias sąlygas veikti tam tikriems fermentams. Vandeninių tirpalų pH priklauso nuo :

- Vandens molekulių jonizacijos. Vanduo – silpnas elektrolitas. Dalis vandens molekulių tirpale yra ionizuotos : $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$.
- Rūgščių jonizacijos $\text{H}-\text{A} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{A}^-$. Čia $\text{H}-\text{A}$ – rūgštis molekulė, A^- – rūgštis anijonas. Jonizuojantis rūgštims, daugėja H^+ ionų, t. y. tirpalo pH mažėja.
- Bazų jonizacijos $\text{X}-\text{OH} \leftrightarrow \text{X}^+ + \text{OH}^-$. Čia $\text{X}-\text{OH}$ – bazės molekulė, X^+ – metalo jonas. Jonizuojantis bazėms, vandeninio tirpalo pH didėja.

Daugeliui medžiagų būdingos bazinės ar rūgstinės savybės. Stiprių bazių ir rūgščių vandeniniai tirpalai yra beveik visiškai ionizuoti, o silpnos rūgštys ar bazės vandeniniame tirpale yra iš dalies ionizuotos.

Lygtis $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$ suprastintai vaizduoja vandens jonizacijos procesą. Ši savaiminė jonizacija aprašoma pusiausvyros konstanta K_c . Bandymais 24°C nustatyta K_c lygi $1,8 \times 10^{-16}$.

$$K_c = \frac{C(\text{H}^+) \cdot C(\text{OH}^-)}{C(\text{H}_2\text{O})} = 1,8 \cdot 10^{-16}.$$

Žinodami, kad vandens koncentracija 55,55 M, galime parašyti:

$$K_w = K_c \cdot C(\text{H}_2\text{O}) = C(\text{H}^+) \cdot C(\text{OH}^-) = 1,8 \times 10^{-16} \times 55,55 = 10^{-14}$$

Konstanta K_w vadinama **vandens sandauga ir lygi 10^{-14}** . Nesant vandenye kitų junginių,

$$C(\text{H}^+) = C(\text{OH}^-) = 10^{-7}.$$

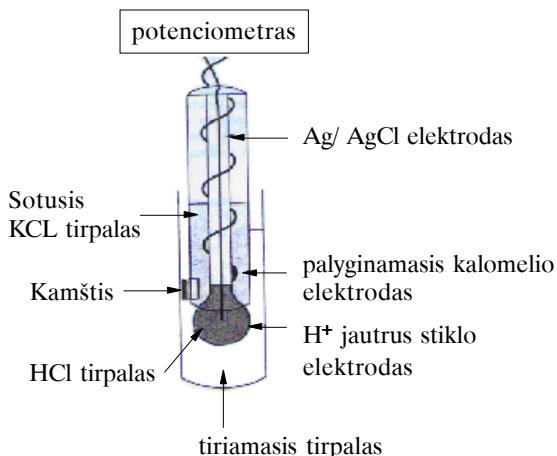
1909 metais S.Siorensenas (S.Sörensen) pasiūlė vandenilio ir hidroksilo jonų koncentracijas reikšti neigiamais dešimtainiais logaritmais : **pH** ir **pOH** (nuo *potentio Hydrogenii*).

Tada $\text{pK}_w = \text{pH} + \text{pOH} = 14$.

Stiprių rūgščių tirpalų pH = 0 – 2, silpnų rūgščių – 3 – 6. Neutralių tirpalų pH lygus 7. Silpnų bazių tirpalų pH = 8 – 11, o šarmų tirpalams būdinga pH = 12 – 14.

3.2. Vandenilio jonų koncentracijos matavimas

Tirpalų pH kiekybiškai įvertinamas **pH-metru** (3.1 pav.) arba **indikatoriniai dažai**. **Indikatoriniai dažai** (lentelė priedas 5) dažniausiai turi silpnų rūgščių savybes. Keičiantis pH, tokios medžiagos keičia spalvą. Idėjus mažus šių medžiagų kiekius į tirpalą, pasikeitus tirpalo spalvai, apytikriaai (paklaida dažniausiai 1–2 pH vienetai) galima daryti išvadą apie tokio tirpalo pH. **Indikatoriniuose popierėliuose** sujungtos keleto indikatorių dažų savybes – tokiu būdu mažėja nustatomo tirpalo pH vertinimo paklaida. Indikatoriniai popierėliai naudojami apytiksliai vertinant tirpalo pH. Tiksliai tirpalo pH galima pamatuoti pH-metru.



3.1 pav. pH - metro schema.

pH-metru vandenilio jonų koncentracija matuojama elektrodu, jautriu vandenilio jonų koncentracijai, prijungtu prie potenciometro. pH elektrodas sudarytas iš dviejų atskirų sistemų : H⁺–jautraus stiklo elektrodo ir palyginamojo elektrodo (kalomelio elektrodas). Elektrodą įmerkus į tiriama tirpalą, ant stiklo elektrodo atsiranda potencialų skirtumas, kuris pamatuojamas potenciometru.

3.3. Silpnų rūgščių ir bazių ionizacija

Rūgštys – junginiai, kurie tirpale ionizuojasi ir išskiria protoną. Rūgšties HA jonizacijos lygtis:

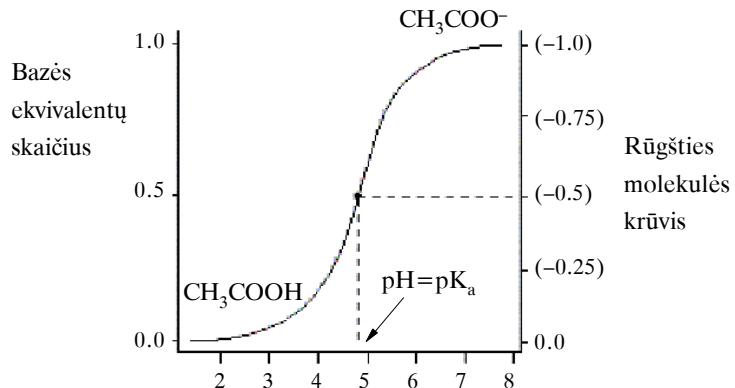


Ši grįžtamoji reakcija aprašoma pusiausvyros konstanta K_a , vadinama rūgšties ionizacijos konstanta:

$$K_a = \frac{C(\text{H}^+) \times C(\text{A}^-)}{C(\text{HA})}.$$

Silpnų rūgščių ionizacijos konstantos – labai maži dydžiai. Pavyzdžiui, acto rūgšties ionizacijos konstanta 24°C lygi $1,75 \times 10^{-5}$. Patogiau naudotis ionizacijos konstantą neigiamaisiais logaritmais – pK_a . Pavyzdžiui, acto rūgštis pK_a lygus 4,75. Žinodami pK_a , galime numatyti, kokios formos (molekulinės ar Jonizuotos) tirpale bus junginys. Kai tirpalo pH yra mažesnė už pK , tirpale vyrauja nejonizuota junginio forma. **Jei pK lygi pH , pusė junginio molekulių yra Jonizuotos.** Jei $pH > pK_a$, vyrauja jonizuota junginio forma (3.2 pav.).

Stiprios rūgštys, pvz., HCl, ionizuojasi (išskiria protonus), esant mažoms pH reikšmėms, o silpnos rūgštys ionizuojasi esant didesnėms pH reikšmėms, kartais pH > 7 . Pavyzdžiui, aminorūgšties tirozino funkcinės grupės – fenilo (labai silpnos rūgšties), $pK_a \approx 10$. Bendra taisyklė – **juo stipresnė rūgštis, tuo jos pK_a mažesnis.**



3.2 pav. Acto rūgšties titravimo kreivė. Molekulės krūvis (dešinioji ordinatė) – acto rūgšties disocijuotų ir nedisocijuotų molekulių krūvio vidurkis

Pavyzdys. Apskaičiuokite $0,01M$ acto rūgšties tirpalo pH ir ionizacijos laipsnį, jei acto rūgšties K_a lygus $1,75 \times 10^{-5}$.

Acto rūgšties ionizacijos lygtis: $\text{CH}_3\text{COOH} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$.

$$K_a = \frac{C(\text{H}^+) \cdot x \cdot C(\text{CH}_3\text{COO}^-)}{C(\text{CH}_3\text{COOH})} = 1,75 \times 10^{-5}.$$

Pažymėkime $x = C(\text{H}^+)$. Tada acetato koncentracija taip pat bus lygi x, o

nejonizuotos rūgšties koncentracija lygi $(0,01-x)$. Taigi $\frac{(x)(x)}{0,01-x} = 1,75 \times 10^{-5}$.

Po akivaizdžių lygties pertvarkymu gauname lygtį

$$1,75 \times 10^{-7} - 1,75 \times 10^{-5} x = x^2.$$

Šią kvadratinę lygtį nesunkiai galime išspręsti išprastu būdu, arba, pastebėjus, kad lygties démuo $1,75 \times 10^{-5}x$ labai mažas, paprasčiau jo nepaisyti. Tada $x^2 = 1,75 \times 10^{-7}$. $x = C(\text{H}^+) = 4,18 \times 10^{-4} \text{M}$.

pH = $-\lg C(\text{H}^+)$ = 3,38. Jonizacijos laipsnis α – skaičius, rodantis, kuri ištirpusių molekulių dalis yra jonų pavidalo. Acto rūgšties ionizacijos laipsnis:

$$\alpha = \frac{C(\text{CH}_3\text{COO}^-)}{C(\text{CH}_3\text{COO}^-) + C(\text{CH}_3\text{COOH})} = \frac{4,18 \times 10^{-4}}{0,01} = 4,18 \times 10^{-2} \text{ arba } 4,18 \text{ %}.$$

T.y. tikтай ≈ 4% acto rūgšties molekulių yra jonizuotos.

Bazės – junginiai, kurie tirpale ionizuojasi ir išskiria OH^- joną. Amino grupes turintiems junginiams (pirminiams, antriniams, tretiniams aminams) būdingos silpnų bazių savybės. Aminų (RNH_2) ionizacija užrašoma lygtimi:



Ši grįžtama ionizacija aprašoma pusiausvyros konstanta K_b , vadinama bazės ionizacijos konstanta:

$$K_b = \frac{C(\text{RNH}_3^+) \cdot C(\text{OH}^-)}{C(\text{RNH}_2) \cdot C(\text{H}_2\text{O})}.$$

Kaip ir rūgščių atveju, dažniau vartojami ionizacijos konstantų neigiamicij logaritmai $\text{p}K_b = -\lg K_b$. Ši konstanta (panašiai, kaip K_a rūgščių atveju) yra kiekybinis bazės stiprumo matas. Bendra taisyklė – **juo stipresnė bazė, juo jos $\text{p}K_b$ didesnis**. Daugiausia bazių $\text{p}K_b$ reikšmės yra didesnės už 7, pvz., etanolamino $\text{p}K_b = 9,5$. Vadinas, tirpale, kurio $\text{pH}=9,5$, pusė etanolamino molekulių yra ionizuotos

3.4. Buferiniai tirpalai

Buferiniu tirpalu, arba tiesiog **buferiu**, vadinamas tirpalas, kurio pH nesikeičia arba keičiasi mažai, tirpalą skiedžiant arba pridėjus nedidelį kiekį tiek stiprios rūgštis ar šarmo.

Buferiniai tirpalai yra kelių rūšių:

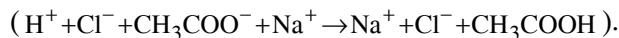
1. Tirpalai, turintys silpną rūgštį ir šios rūgšties stiprios bazės druskos (pvz., $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$). Tai vadinamieji rūgstiniai buferiai.
2. Tirpalai, turintys silpną bazę ir druską, sudarytą iš tos bazės ir stiprios rūgšties anijono (pvz., $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$). Tai vadinamieji baziniai buferiai.

Buferinis silpnos rūgštis ir jos druskos (pvz., $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$) veikimas: įdėjus į tokį tirpalą šiek tiek tiek šarmo, pvz., NaOH , vyksta procesas :



Šarmas suriša silpnos rūgštis HA protonus H^+ ir susidaro silpnas elektrolitas H_2O . Aišku, didėja silpnos rūgštis anijono A^- koncentracija.

Įdėjus į tokį tirpalą šiek tiek tiek stiprios rūgštis, pvz., HCl , didėja silpnos rūgštis koncentracija:



Tai yra stiprios rūgštis protonai H^+ susiriša su druskos anijonu A^- , susidaro silpna rūgštis.

Buferiniams tirpalui, sudarytam iš silpnos rūgštis HA ir jos druskos D (pvz., $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COONa}$), parašykime lygtį, siejančią tokio tirpalo pH ir silpnos rūgštis ir jos druskos koncentracijas ($C(\text{HA})$, $C(\text{A}^-)$). Silpnos rūgštis HA jonizacijos pusiausvyros konstanta K_a :

$$K_a = \frac{C(\text{H}^+) \cdot C(\text{A}^-)}{C(\text{HA})}.$$

Esant tirpale vienvardžių druskos anijonų (A^-), rūgštis jonizacija vyks daug lėčiau. Praktiškai silpnos rūgštis koncentracija po jonizacijos bus lygi pradinei rūgštis koncentracijai $C(\text{HA})$. Druskos anijonų (A^-) koncentracija bus lygi druskos koncentracijai $C(D)$.

$$C(\text{H}^+) = \frac{K_a \times C(\text{HA})}{C(\text{A}^-)}$$

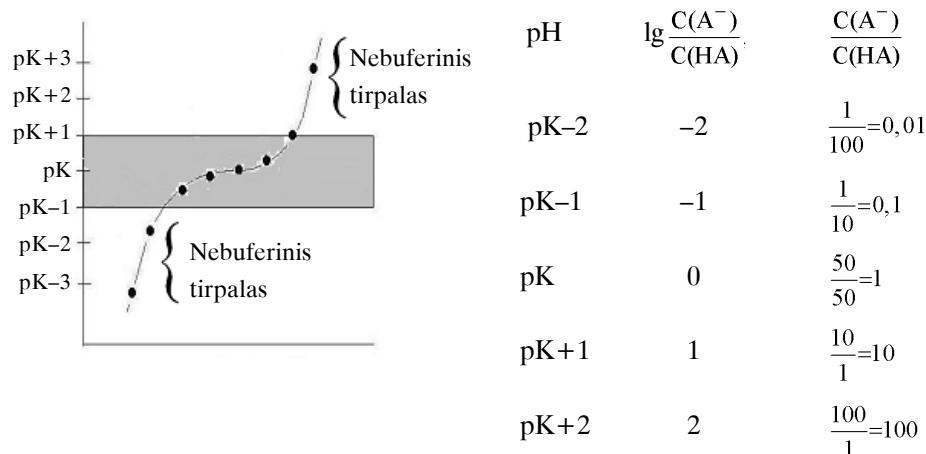
Taigi $\text{pH} = \text{p}K_a + \lg \frac{C(\text{A}^-)}{C(\text{HA})}$ arba

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg \frac{C(A^-)}{C(HA)} \quad (1).$$

Lygtis (1) vadinama **Hendersono ir Haselbacho** (Henderson–Hasselbach) lygtimi.

Iš (1) lyties matome, kad pakeitę **santykį** $\frac{C(A^-)}{C(HA)}$, pvz., 10 kartų, santykio dešimtainis logaritmas (kartu ir pH) pasikeis tik per vienetą. Skiedžiant buferinius tirpalus, vandenilio jonų koncentracija (vadinasi, ir pH) nesikečia, nes nekinta santykis $\frac{C(A^-)}{C(HA)}$.

Buferinio tirpalo veikimas, jo sugebėjimas surišti vandenilio ar hidroksilo jonus parodytas 3.3 paveiksle.



3.3 pav. Buferinio tirpalo veikimas

Pavyzdys. Kaip pakis buferinio tirpalo, sudaryto iš 0,1M acto rūgšties ir 0,1M natrio acetato, pH, į tirpalą įnešus 0,05M NaOH? Acto rūgšties K_a lygus $1,75 \times 10^{-5}$. Kaip šis kiekis šarmo pakeistų vandens pH?

Hendersono ir Heselbacho lygtis acetatiniam buferiu:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg \frac{C(A^-)}{C(HA)}, \text{ pH} = 4,46 + \lg \frac{0,1+0,05}{0,1-0,05} = 4,76 + 0,48 = 5,24.$$

Vandens pH=7. Idėjus į vandenį 0,05 M NaOH, tirpalo pH = $\text{pK}_w - \text{pOH} = 14 - 1,31 = 12,69$. Tai yra buferinio tirpalo pH, idėjus 0,05M NaOH pakito per 0,78 pH, o vandens – per 5,69 pH.

Analogiški procesai bus stebimi $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ buferinėje sistemoje (bazinis buferinis tirpalas). Šioms sistemoms Hendersono ir Haselbacho lygtis:

$$\text{pH} = \text{pK}_w - \text{pK}_b + \lg \frac{C(B)}{C(D)} = 14 - \text{pK}_b + \lg \frac{C(B)}{C(D)}.$$

Čia K_b – silpnos bazės disociacijos konstanta, K_w – vandens disociacijos konstanta; $C(B) = [B]$ – silpnos bazės B koncentracija, $C(D) = [\text{BH}^+]$ – silpnos bazės katijono BH^+ koncentracija.

Buferinis veikimas būdingas ir **druskų mišiniams**. Druskoms **hidrolizuojanties** viena iš druskų sukelia labiau rūgštinę, kita – labiau bazinę reakciją. Pavyzdžiui, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$. Šios buferinės sistemos labai svarbios žmogaus organizmo gyvybiškai svarbių sistemų pastoviam pH palaikyti.

Buferinio tirpalo veikimo sritį lemia silpnos rūgštis ar bazės pK reikšmė. Laikoma, kad buferines savybes sistema turi intervalę **pK ± 1**.

Buferiniai tirpalai skiriasi savo gebėjimu palaikyti nekintamą pH. Jei vieno tirpalo pH pakito mažiau, pvz., išėjus šiek tiek HCl, negu kito buferinio tirpalo, sakome, kad pirmajam tirpalui būdinga didesnė **buferinė talpa**. Buferinė talpa galime ivertinti kiekybiškai. **Tai šarmo ar rūgšties kiekis (ekvivalentais), kurį išėjė į 1 l tirpalo, šio pH pasikeičia vienetu**. Buferinė talpa visada yra teigiamas dydis, todėl (2) lygtis galioja šarmo atveju, o (3) – rūgšties atveju :

$$\beta = \frac{d[B]}{dpH} \quad (2);$$

$$\beta = - \frac{d[B]}{dpH} \quad (3);$$

Buferinė talpa gali būti apskaičiuota teoriškai. Buferio, į kurio sudėtį įeina silpna rūgštis, buferinė talpa, kai $\text{pH} = \text{pK}$, gali būti apskaičiuota taip (4):

$$\beta_{\max} = \frac{2,303}{4} C \quad (4),$$

C – bendra silpnos rūgšties HA ir jos druskos A^- koncentracija

Visiems buferiniams tirpalams yra būdingas taip vadinamasis **temperatūros efektas**. Daugumos buferių pH silpnai kinta, pakitus temperatūrai. Tačiau tam tikrų buferinių tirpalų nustatyta kambario temperatūros sąlygomis pH gali skirtis nuo darbinės tirpalo pH reikšmės. 0,05 M TRIS/HCl tirpalo, kurio pH yra 7,05 temperatūrą sumažinus nuo 37°C iki 23°C , tirpalo pH padidėja iki 7,20. Tokie vandenilio jonų koncentracijos pokyčiai gali turėti įtakos tiriamam procesui ir jų nepaisyti negalima. Šiuo konkretiū

atveju pH pasikeitimą per 0,15 pH vieneto, atitinkantis $\Delta [\text{H}^+]$ skiriasi net 41%. Populiariems buferiams nustatyti vadinamieji **temperatūros koeficientai**. Pvz., TRIS'o atveju temperatūros koeficientas $-0,028 / {}^\circ\text{C}$. Jei gaminate 0,05 M TRIS-HCl pH 7,4 buferį kambario (23°C) temperatūros sąlygomis, o naudosite jį 4°C , praktiškai reikia ruošti 6,86 pH tirpalą. Esant 40°C temperatūrai, šio tirpalo pH bus 7,4. Aišku, daugumos buferinių tirpalų temperatūros koeficientas daug mažesnis ir didelės įtakos šių tirpalų pH neturi.

3.5. Buferinių tirpalų ruošimas

Buferiniai tirpalai ruošiami dvejopai:

- sumaišant silpną rūgštį ir jos druską (rūgštiniams buferiams) arba silpną bazę ir jos druską (baziniams buferiams) tam tikru santykiu. Žinant pK_a arba pK_b galima paruošti norimo pH tirpalą. Sudedamųjų dalijų santykį nesunkiai galima apskaičiuoti iš Hendersono ir Haselbacho lygties.
- tirpalai ruošiami iš silpnos rūgštis ar silpnos bazės, palengva pridedama šarmo ar stiprios rūgštis iki norimo pH (tirpalo pH pokyčiai stebimi pH-metru).

Pavyzdys. Kaip paruošti litrą 0,05 M TRIS-HCl pH 8,2 tirpalą?

$M_r(\text{TRIS})=121,1$. Litre 0,05 M tirpalo yra 50 mmol, t. y. 6,055 g TRIS'o bazės. Pasvérę šį medžiagos kiekį, ištirpiname mažesniame nei galutinis dejonizuoto vandens tūryje (pvz., $\geq 600 \text{ ml}$). Mažomis porcijomis įdedame į tirpalą HCl, pH-metru stebime pH kitimą iki reikiamas pH – 8,2. Gautą tirpalą (pH = 8,2) atskiedžiame iki 1l.

6 lentelėje (žr. priedas) pateiki dažnai laboratorijoje naudojami buferiai. Parinkdami buferinę sistemą atsižvelgiame:

- į darbinę, t. y. rekomenduojamą naudoti tirpalo pH sritį. **Tinkamiausia** laikoma ta **buferinė sistema**, kurios pK arčiausias tirpalo pH. Jei $\text{pH} = \text{pK}$, tirpalo buferinė talpa didžiausia.
- ar kitos tirpalo sudedamosios dalys nereaguja su buferiu. Pavyzdžiu, tiriant Zn^{2+} ir Pb^+ įtaką tam tikram medžiagų apykaitos procesui, nepatartina naudoti karbonatinio buferio.

3.5.1. Buferinio tirpalо gaminimas, buferinės tirpalо talpos nustatymas

Naudojantis Hendersono ir Haselbacho lygtimi, apskaičiuoti fosfato buferinės sistemos sudedamųjų dalių santykį, ruošiant tam tikro pH tirpalus. Paruošti tokius tirpalus ir ištirti šių tirpalų buferines savybes.

Biochemijos darbų metu dažnai naudojamas fosfatinis buferis. Šią buferinę sistemą sudaro $H_2PO_4^-$ (silpnas rūgštis) ir HPO_4^{2-} (silpnos rūgšties anijonas, *konjuguotoji bazė*). KH_2PO_4 (silpnos rūgšties) $pK_a=6,8$. $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ -buferinei sistemai Hendersono ir Haselbacho lygtis:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}.$$

kai $\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}=1$, t. y. $[HPO_4^{2-}] = [H_2PO_4^-]$, $pH = pK_a = 6,8$.

Cheminiai reagentai:

1. 0,05 M K_2HPO_4 ir 0,05M KH_2PO_4 tirpalai.
2. 0,1 N NaOH ir 0,1 N HCl.
3. KH_2PO_4
4. 0,1N KOH.

2-
4

Darbo eiga:

1. Naudojant 0,05 M K_2HPO_4 ir 0,05M KH_2PO_4 tirpalus, paruošti po 20 ml tirpalų, kurių pH būtų **5,8; 6,8; 7,8**. Sudedamųjų dalių santykį, reikalingą nurodytam tirpalui ruošti, apskaičiuokite vartodami Hendersono ir Haselbacho lygtį.

$$H_2PO_4^- \leftrightarrow HPO_4^{2-} + H^+$$
. Rūgšties pK_a lygus 6,8.
5. Patikrinkite gautų tirpalų pH, naudodami pH-metrą.
6. Paimkite po 5 ml iš pagamintų tirpalų (pH 5,8, 6,8 ir 7,8). Atskieskite šiuos mėginius vandeniu dešimt kartų.
7. pH-metru pamatuokite dešimt kartų praskiestų tirpalų pH.
8. Nustatykite tirpalų, kurių pH 5,8 ir 6,8 buferinę talpą pagal rūgštį ir šarmą. Buferinę talpą apytikriai galime ivertinti tokiu būdu. Prie 10 ml tam tikro pH tirpalо pridedame 1,0 ml 0,1 N NaOH arba 0,1N HCl ir pamatuojamas tirpalо pH. Buferinę tirpalо talpą apskaičiuojame iš formulės:

$$\beta \approx \frac{NV_1}{(pH_1 - pH_0)V_0};$$

kur $pH_1 - pH_0 = \Delta pH$ – pH-metro rodmenų skirtumas, iðėjus NaOH arba HCl, N – iðedamos rūgšties ar šarmo ekvivalentų moliai, V_1 – iðedamos rūgšties ar šarmo tūris, V_0 – pradinis tirpalо tūris.

9. Nustatykite dešimt kartų atskiestų tirpalų, kurių pH 6,8 ir 5,8 buferinę talpą pagal rūgštį ir šarmą.
10. Palyginkite nustatyta buferinės talpos reikšmę $\text{pH} = \text{pK} = 6,8$ su teoriškai apskaičiuota atsižvelgiant į (4).
11. Paruoškite 100 ml 0,05 M fosfatinį buferį, kurio pH būtų 6,8, antruoju būdu, t. y. titruodami KH_2PO_4 tirpalą 0,1N KOH iki reikiama pH:
 - apskaičiuokite, koks kiekis KH_2PO_4 turi būti pasvertas, norint paruošti 0,05M tirpalą;
 - ištirpinkite druską mažame tūryje vandens ($\approx 60\text{ml}$);
 - mažomis porcijomis pridėdami 0,1 N KOH, pasiekite, kad tirpalo pH būtų 6,8
 - tirpalo tūri menzūroje papildykite iki 100 ml.

Kontroliniai klausimai :

1. Buferiniai tirpalai. Hendersono ir Haselbacho lygtis buferiniams tirpalams, į kurių sudėtį įeina silpna rūgštis ir tirpalams, į kurių sudėtį įeina silpna bazė.
2. Tarp daugybes buferinių sistemų, kurios dalyvauja palaikant vidulastelinį organizmo skysčių pastovų pH [6,8; 7,8], labai svarbios yra HCO_3^- – H_2CO_3 ($\text{pK}_a=8,3$) ir HPO_4^{2-} – H_2PO_4^- ($\text{pK}_a=6,8$) sistemos. Parašykite lygtis, kaip šių buferinių sistemų sudedamosios dalys reaguoja su rūgštinius ir bazēmis.
3. Kokios aminorūgštys pasižymi buferinėmis savybėmis fiziologinėse (t. y. pH [6,8; 7,8]), salygoje?
4. Glicino α -COOH grupės $\text{pK}_a=2,34$, NH_2 – grupės $\text{pK}_a=9,60$. Nubrėžkite glicino titravimo kreivę. Kuriais pH intervalais glicino tirpalas turi buferinių savybių? Koks glicino pI?
5. Tribazės fosforo rūgšties pKa reikšmės yra 2,2; 7,2; 12,3. Parašykite kokios formos H_3PO_4 molekulė bus pH 0, pH 4, pH 9 ir pH14. Koks tirpalo, sudaryto iš 0,1 M NaH_2PO_4 ir Na_2HPO_4 pH?

Literatūra:

1. Rilbe H.(1996) pH and Buffer Theory – a new Approach, Wiley, New York.
2. Reed R., Holmes D., Weyers J., Jones A. (2003) Practical skills in Biomolecular sciences, Pearson Educated Limited.

4. Audinių ir ląstelių ardynas ir frakcionavimas

Ardymas – vyksmas, kurio metu struktūriškai suardoma ląstelių ir/ar audinių struktūrų vientisumas. **Suardė ląsteles ir audinius**, toliau mes juos **frakcionuojame**, t. y. dalijame į daug atskirų sudėtinės dalijų (frakcijų), norédami išgryninti pavyzdžius tyrimui. **Ląstelių suspensijos ir audiniai gali būti frakcionuojami daugybe būdu**, atsižvelgiant į dalis, kurias norime išgryninti (pvz., mitochondrijas, plazminas membranas, DNR, RNR, tirpius baltymus). Labai svarbu, kad kitas eksperimentatorius, norédamas pakartoti jūsų frakcionavimą, žinotų, kiek pradinės medžiagos jis/ji turėtų paimti. Dokumentuojant ląstelių/ audinių frakcionavimo eigą, reikia įvertinti **gryninamos medžiagos kiekį** kiekvienoje frakcijoje. Tai vadinama **išeigos** skaičiavimu. Skaičiuojant išeigą, reikia žinoti visų frakcijų tūri ir gryninamos medžiagos koncentraciją frakcijoje:

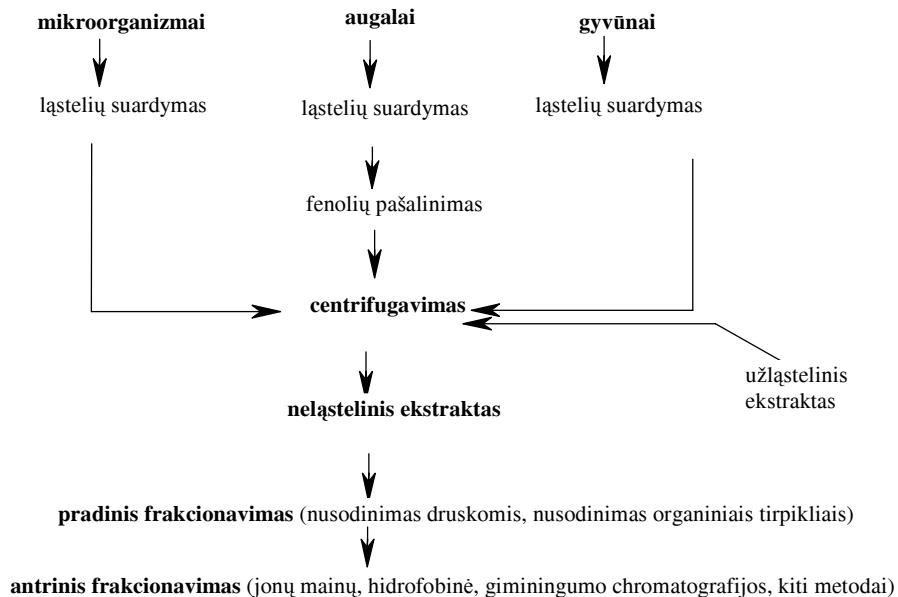
$$\text{išeiga} = [\text{frakcijos tūris}] \times [\text{gryninamos medžiagos kiekis frakcijoje}].$$

Dauguma audinių ir ląstelių ardymo ir frakcionavimo metodų buvo sukurti arba bent pasiūlyti iki 1960 – 1970 metų. Šiuolaikiniai laimėjimai dažniausiai susiję su šiu metodu optimizavimu ir automatizavimu. Šiandien yra sukurti nuodugnūs **protokolai** tam tikriems produktams išskirti ir išgryninti iš įvairiausios biologinės medžiagos: **Current Protocols in Protein Science** (CPPS, Coliegen et al, 1998), **Current Protocols in Molecular biology** (CPMB, Ausubel F. M. et al, 1999). Šie protokolai siūlo **strategiją** tam tikro objekto sudėtinės dalij gryninimui. Pavyzdžiu, strategija skirsis ir priklausys nuo to, ar tikslinis produktas yra ląstelėje, ar neląstelinėje frakcijoje. Pastaruoju atveju tereikia atskirti terpę nuo ląstelių. Gali būti, kad tikslinė dalis yra tam tikroje ląstelės organelėje. Tada tikslina produktą skirti ne iš viso ląstelės lizato, o pirmiausia išskirti šią ląstelės organelių frakciją. Protokolų pasiūlyta strategija turi būti **optimizuota**: patikslinta frakcionavimo buferių sudedamųjų dalij santykis ir koncentracijos.

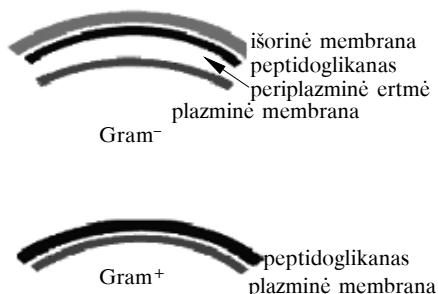
4.1. Ląstelių ir audinių suardymas

Šaltinis (mikroorganizmai, augalai, gyvūnai, augalų ir gyvūnų audiniai), iš kurio skiriamas produktas (baltymai, fermentai, nukleorūgštys, lipidai, ląstelės organelės), labai dažnai lemia ardymo būdą.

Visų šių objektų ląstelės turi **plazminę membraną**. Gyvūnų ląstelėse – tai vienintelė užtvara, skirianti ląstelės turinį nuo išorinės aplinkos. Ši užtvara gana lengvai suardoma. Bakterijų ir augalų plazminė membrana apsupta tvirtos **ląstelės sienelės**. Ląstelių sienelė – pagrindinė kliūtis ardant ląsteles ir audinius. Bakterijų sienelės pagrindinė sudedamoji



4.1 pav. Bendra šaltinio frakcionavimo schema



4.2 pav. Gramneigiamujų ir gramteigiamujų bakterijų sienelės sandara

dalis – peptidoglikanas (4.2 pav.). Šis peptidoglikano sluoksnis ypač gramteigiamujų bakterijų gali būti suardomas veikiant fermentu **lizocimu**. Išorinė gramneigiamujų bakterijų membrana apsaugo bakteriją nuo lizocimo poveikio. Dėl šios priežasties gramneigiamosios bakterijos prieš veikiant su lizocimu inkubuojamos tirpale, turinčiame EDTA (EDTA suriša Ca^{2+} ir taip destabilizuja išorinę membraną). Ypač tvirtos grybų ir mielių ląstelių sienelės, turinčios daugiau kaip 90% polisacharidų (pvz., chitino, manano). Augalų ląstelių sienelės sudarytos iš daugelio celiuliozės sluoksnii,

turinčių lignino ir hemiceliuliozės intarpų. Aišku, šios išorinės ląstelių užtvaros suteikia ląstelėms ne tik formą, bet ir **atsparumą suardymui**. Ypač atsparios suardymui yra augalų ląstelės. Vadinasi, visada turime parinkti tinkamą ląstelių suardymo metodą ir homogenizacijos buferį.

Suardę ląsteles ir/ar audinius gauname **homogenatą**. **Homogenatas** – ląstelių ar audinių ekstraktas, sudarytas iš įvairaus dydžio molekulių (baltymų, lipidų, nukleorūgščių ir t. t.), ląstelės organelių, nesuardytų ląstelių. Jei homogenizacijos metodas ir homogenizacijos buferis parinkti teisingai – **suardomas ląstelių sienelės ir plazminės membranos, o ląstelės organelių membranas lieka nepažeistos**. Suardžius ląstelės organelių membranas, paskleidžiamos medžiagos (pvz., fenolai, peptidazės), kurios toliau ardo organeles ir biomolekules (4.1 pav.).

Ardant audinius ir ląsteles išsiskiria daug šilumos, todėl skyrimo procedūros metu baltymai ir kitos biomolekulės gali denatūruoti ir sulipti (agreguotis). Siekiant to išvengti homogenizavimo procedūros atliekamos **kaip galima greičiau ir esant 0–4°C temperatūrai**, visi darbui reikalingi **įrankiai ir tirpalai prieš darbą turi būti atšaldyti**.

4.2 Ląstelių ir audinių suardymas, nenaudojant detergentų.

Literatūroje įprasta ląstelių ir audinių **ardymo metodus** skirti į dvi grupes, t. y. metodus, kurių metu naudojami detergentai ir metodus, kurių metu detergentai nenaudojami. Nenaudojant detergentų ląstelės sienelės ir membranos suardomos mechaniskai, taip pat fizikiniai ir cheminiai būdais (žr. 4.1 lentelę). Dažniausiai frakcionavimo protokoluose abu šie būdai (mechaninis suardymas ir suardymas, naudojant detergentus) taikomi kartu, ištraukiant detergentą iš homogenizacijos buferio sudėtį.

4.3. Ląstelių ir audinių ardymas, naudojant detergentus

Naudojant detergentus, ląsteles ir audinius galima **suardyti lengviau ir švelnesnėmis sąlygomis**. **Detergentai** – įvairios cheminės sudėties (žr. 4.5 pav.) junginiai, turintys hidrofobines ir hidrofilines sritis. Detergentai savo hidrofobine dalimi išterpia į baltymo hidrofobinę sritį ar membranos fosfolipidinį dvisluoksnį ir suardo baltymo ar membranos vientisumą. Detergentai tirpina membranų lipidus ir baltymus, be to, suardo lipidų–lipidų, baltymų–baltymų, baltymų–lipidų sąveikas. Panašiai kaip lipidai, detergentai patys gali jungtis ir sudaryti micleles (4.5 pav.).

Detergentai skiriami į joninius (Pav.4.5– B ir E), cviterjoninius (pav.4.5– C) ir nejoninius (pav.4.5–A ir D). Nejoniniai ir cviterjoniniai detergentai mažiau denatūruoja baltymus, negu joniniai detergentai.

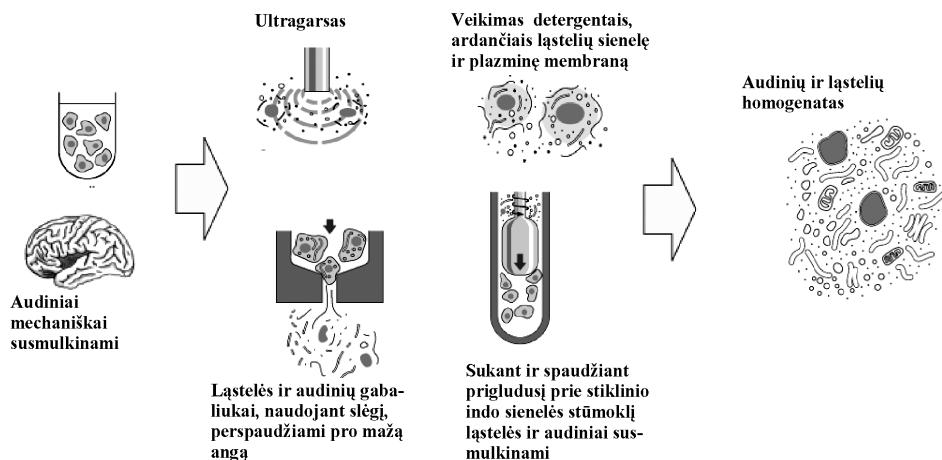
4.1 lentelė. Audinių ir ląstelių suardymo būdai

<i>Suardymo būdas</i>	<i>Priemonės</i>	<i>Suardymo apibūdinimas</i>
Mechaninis	Lékštelė ir grūstuvėlis	Ląstelės ar audiniai (labai dažnai augalai) sutrinami, dažnai prieš tai atšaldžius skystu azotu
	Voringo (Waring) homogenizatorius	Sukdamiesi peiliai susmulkina ir sutrina ląsteles ir audinius (4.4 – C pav.)
	Daunco (Dounce) homogenizatorius	Ląstelės ar audiniai, naudojant slėgi, sutrinami (4.4 – B pav.)
	Potter–Elvehjem homogenizatorius	Ląstelės ar audiniai, naudojant slėgi, sutrinami (4.4 – D pav.)
	French presas	Ląstelės ar audiniai, naudojant slėgi, perspaudžiant pro siaurą angą ar plyšį
Ultragarsinio būdu	Ultragarso dezintegratorius	Aukšto dažnio garsas suardo ląstelių sienelės
Atšaldymas/ sušildymas	Šaldiklis, kartais skystas ledas/etanolis	Susidaro ledo kristalai ir kartotini atšaldymo/sušildymo ciklai suardo ląsteles
Cheminis	Organiniai tirpikliai. Dažniausiai naudojamas fenolis arba chloroformo ir metanolio mišiniai	Tirpinami membranų lipidai ir suardomos membranos
	Chaetropiniai junginiai (kalio tiocianatas, kalio bromidas, ličio dijodsalicilatas ir kt.)	Destabilizuojami membranų lipidai, membranos lengviau suardomos
Fermentinis	Chitinazės, pektinazės, lipazės, peptidazės, celiuliazės, lizocimas arba fermentų mišiniai	Suardžius fermentais ląstelės sienelę gaunami protoplastai, kurie lengvai homogenizuojami

4.4 Homogenizacijos tirpalo sudedamosios dalys

I homogenizacijos tirpalo **būtinieji sandai** – buferinis tirpalas ir druskos, lemiančios homogenizacijos tirpalo osmosines savybes. Ląstelės citozolio pH ≈7,5, taigi homogenizacijos tirpalo pH irgi turėtų būti silpnai šarminis – pH 7–8. Audiniams ir ląstelėms homogenizuoti naudojami fosfato, TRIS, HEPES ar kiti organiniai buferiai, kurių pH tarp 7 ir 8 (pK = 7–8). Ląstelių ar audinio rūšis, audinio ir homogenizavimo tirpalo santykis lemia buferio koncentraciją. Dažniausiai homogenizacijos tirpalo buferio koncentracija 20–50 mM.

Ląstelių membranų ir sienelių suardymui labai svarbios homogenizacijos tirpalo osmosinės savybės. Ląstelių irimas palengvinamas, vartojant **hipotoninį** homogenizavimo tirpalą. Tokiu būdu ląsteles išbriksta, fizikinis ardomasis poveikis sustiprinamas. Dažniausiai homogenizacijos tirpaluose druskų koncentracija 50–150 mM. Joninei tirpalui jégai palaikyti naudojamos NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ druskos. Skiriant žinduolių



4.3 pav. Audinių ir laštelų suardymas

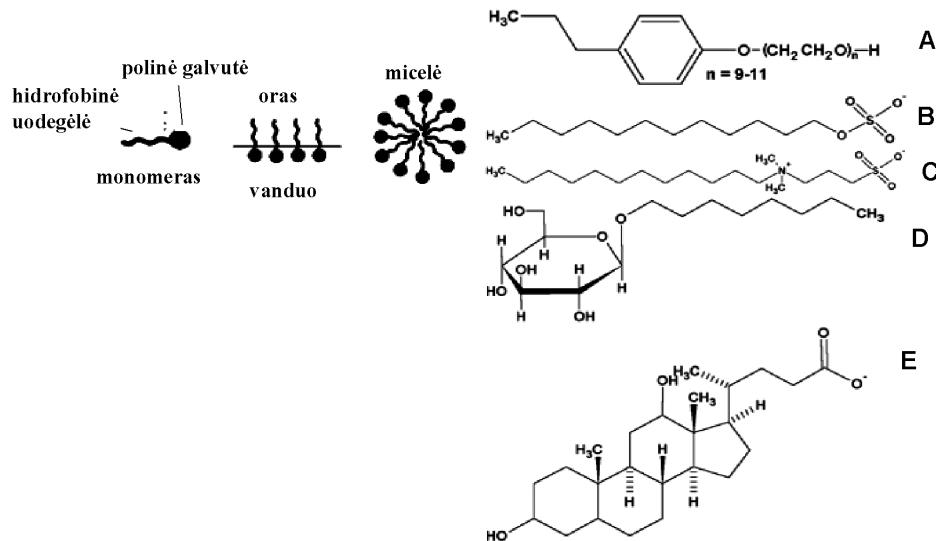


4.4 pav. Prietaisai audiniams ir laštelėms ardyti.
A–ultragarsinis dezintegratorius; B– Daunco homogenizatorius; C– Voringo (Waring) homogenizatorius, D – Porterio homogenizatorius

mitochondrijas dažniausiai vartojami homogenizacijos tirpalai, turintys 0,15 M KCl arba 0,25–0,3 M sacharozės, skiriant augalų mitochondrijas, naudojami tirpalai, turintys 0,2–0,5 M sacharozės arba manitolio. Tokių tirpalų osmotiškumas panašus į citozolio, taigi skiriama mitochondrijų membrana nepažeidžiama.

Į homogenizacijos tirpalą sudėtį dažnai įeina ir kiti junginiai.

- **Metalus chelatuojantys junginiai.** Dažniausiai homogenizacijos tirpaluose yra EDTA (suriša dvivalenčius metalų jonus, ypač Ca^{2+} ir Mg^{2+}) ar EGTA (atrankiai suriša Ca^{2+}). Šių metalų jonai – proteolitinių fermentų aktyvifikliai. Dažniausiai EGTA ir EDTA koncentracija homogenizavimo tirpale 1 mM. Taigi EDTA ar EGTA homogenizacijos tirpale suriša metalų jonus, mažina oksidacines pažaidas ir balytmų agregaciją.
- **Glikozė, sacharozė ar manitolis** (250–500 mM). Stabilizuja mitochondrijų ir lizosomų membranas, stabdo proteazių išsiskyrimą.



4.5 pav. Detergentai.

Nonidet-NP-40 (A), natrio dodecilsulfatas (NDS) (B); sulfobetainas (SB12) (C); n-oktilgliukozidas (D); deoksicholatas (E)

- **Glicerolis (5–10%).** Glicerolis stabilizuojia balytus.
- **Detergentai** (pvz., deoksicholatas, Triton X-100). Detergentai didina mažai tirpių balytų tirpumą, ardo membranines struktūras. Dažniausiai detergentų koncentracija 0,1–1%.
- **Ligandai, metalų jonai** (Mg^{2+} , ATP, GTP). Dažniausiai naudojamos 1–10 mM ligandų koncentracijos stabilizuojia gryninamus balytus.
- **Peptidazių slopikliai (inhibitoriai)** (pvz., aprotininas, benzamidinas, PMSF, EDTA, EGTA). Proteazių slopiklių sudėtis priklauso nuo šaltinio, iš kurio skiriamas produktas. Pavyzdžiu, frakcionuojant *E.coli*, proteazės neaktyvios, jei homogenizacijos tirpale yra 1 mM EDTA ir 1 mM PMSF, dirbant su mielėmis frakcionavimo tirpaluose dažniausiai be 1 mM EDTA ir 1 mM PMSF yra ir 1 µg/ml leupeptino bei 1 µg/ml pepstatino A. Proteazių inhibitoriai labai retai naudojami vienu metu.
- **Antioksidantai (redukuojantys junginiai).** Tai ditiotreitolas (DTT), β -merkaptoetanolis (β -ME), askorbo rūgštis ir kt. Dažniausiai homogenizacijos tirpale šių junginių koncentracija 1–10 mM (0,05%). Antioksidantai mažina balytų sulfidrilinių grupių oksidaciją, kartu didina jų stabiliumą.
- **Jaučio serumo albuminas (BSA).** Šio balytmo dažniausiai dedama į homogenizacijos tirpalus, skiriant mitochondrijas. BSA suriša riebalų rūgštis

(BSA funkcija krauso plazmoje), kurios susidaro fosfolipazėms veikiant fosfolipidus, taip pat fenolius, kurie susidaro suirus vakuolėms. Esant homogenizacijos tirpale BSA, mažėja frakcionuojamų mitochondrijų baltymų pažaidos (proteolitiniai fermentai naudoja ši alternatyvų substratą, kurio koncentracija daug didesnė nei kitų baltymų).

- **Polivinilpirolidonas.** Dažniausiai šio polimero dedama į homogenizacijos tirpalus, ardant augalų ląstelės arba audinius. Polivinilpirolidonas suriša fenolius.

Nėra vieno metodo, tinkamo visoms ląstelėms ir/ar audiniams homogenizuoti, nėra buferio, kurio sudėtis tinkama visoms ląstelėms ir/ar audiniams homogenizuoti.

Frakcionuojant ląstelės ir audinius dažnai reikia optimizuoti homogenizacijos tirpalo sudėtinių dalių santykius. Kaip pradinis buferis, pvz., gali būti panaudotas **buferis A** (50 mM TRIS-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glicerolis).

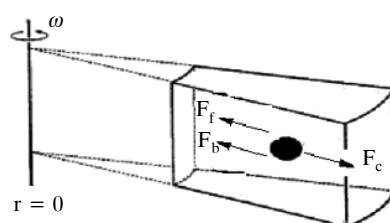
4.5. Ląstelių ir/ar audinių frakcionavimo būdai.

Centrifugavimas.

Gravitacijos jėgų veikiamos didelės dalelės nusėda. Nusėdimo greitis priklauso nuo **dalelių parametru** (masės, dydžio, tankio), taip pat **tirpalo**, kuriame suspenduotos dalelės, **klampumo**. **Centrifugos** – prietaisai, kurie, sukdamai dalelę apie centrinę ašį, sukuria didesnę išcentrinę jėgą nei gravitacinė žemės jėga, tuo labai pagreitinamas dalelių nusėdimas.

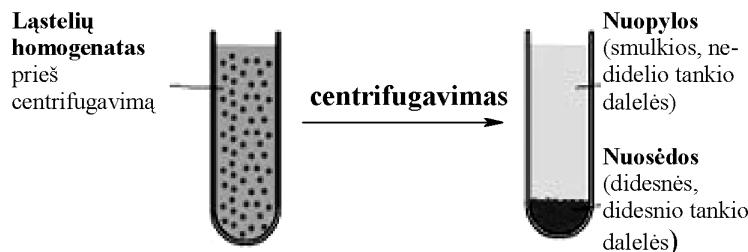
Centrifugavimo metu atskiriamos daleles, kurių skiriasi **masė, dydis ir tankis**, nes jų nusėdimo greitis proporcingas išcentrinei jėgai (4.6 pav.). Frakcionavimą (nuosėdos/nuopylos) lemia:

- dalelių dydis, forma ir tankis. Juo didesni dalelės masė, tankis, tūris, juo ji nusėda greičiau;
- tirpalo klampumas. Juo didesnis tirpalo, kuriame suspenduota dalelė, tankis, juo lėčiau ši nusėda;
- centrifugavimo jėga. Juo didesnė centrifugavimo jėga ($w^2 r$), juo greičiau dalelė nusėda.



4.6 pav. Jėgos, veikiančios dalelę centrifugavimo metu:

- $F_c = m w^2 r$ (išcentrinė jėga).
- $F_f = -f v$ (trinties jėga).
- $F_b = -m_o w^2 r$ (priešinimosi jėga). Čia m – sedimentuojančios dalelės masė, w – kampinis greitis, r – dalelės nuotolis iki sukimosi ašies; m_o – dalelės išstumto tirpalo masė, f – trinties koeficientas, v – dalelės sedimentacijos greitis



4.7 pav. Ląstelių homogenato centrifugavimas.

Po centrifugavimo dažniausiai yra dvi frakcijos – nuopylos (supermatantas) ir nuosėdos

4.2 lentelė. Centrifugų rūšys ir jų techniniai duomenys

Techniniai duomenys	Centrifugų rūšys		
	Nedidelio greičio	Didelio greičio	Ultracentrifuga
Greitis RPM (10^3)	2–6	18–30	35–120
Didžiausias RCF (10^3)	8	100	700
Šaldymas	Tam tikros	Taip	Taip
Vakuumo sistema	neturi	Turi	Turi
Taikymas frakcionuoti:			
Ląsteles	Taip	Taip	Taip
Branduolius	Taip	Taip	Taip
Ląstelės organeles	Tam tikras	Taip	Taip
Membranos frakcijas	Ne	Tam tikras	Taip
Ribosomas/polisomas	Ne	Tam tikras	Taip
Makromolekules	Ne	Tam tikras	Taip

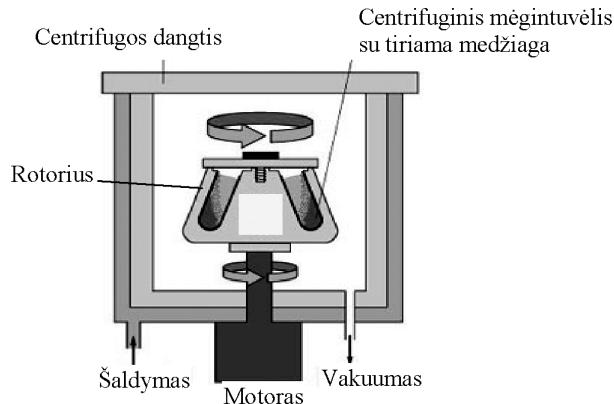
Dalelės nusėdimo (sedimentavimo) greitis išcentrinės jėgos vienetui vadinamas

sedimentacijos koeficientu (s). $s = \frac{v}{w^2 r}$. Jai dalelės masė išreikšta g (gramais), o

išcentrinė jėga g/s (gramai/sekundės), makromolekulių sedimentacijos koeficiente kitimo intervalas 10^{-13} – 10^{-9} sekundžių. Skaičius 10^{-13} sekundžių vadinas **Svedbergo konstanta (S)** arba tiesiog **svedbergu**. Pavyzdžiu, hemoglobino sedimentacijos koeficientas yra 4×10^{-13} sekundžių arba 4S, prokariotų rRNR sedimentacijos koeficientas 16S arba 16×10^{-13} sekundžių. Sedimentacijos koeficientas S didėja, didėjant dalelės masei, tačiau priklauso ir nuo dalelės dydžio bei formos.

Laboratorių darbų metu centrifugos – nepakeičiami įrankiai frakcionuojant ląstelių ir audinių ekstraktus. Centrifugų techniniai duomenys labai skirtinėti. Jų techniniai duomenys pateikti 4.2 lentelėje.

Aprašant frakcionavimą centrifuguojuant, reikia nurodyti, kokiui **pagreičiu** (pagreitis žymimas RCF arba g) buvo veikiama dalelė centrifugavimo metu. RCF rodo, kiek kartų didesnė nei gravitacinė žemės jėga ($g = 9,8 \text{ m s}^{-2}$) buvo veikiama dalelė centrifugavimo metu ($\text{RCF} = \times \cdot g$). Ši jėga priklauso nuo :



4.8 pav. Centrifugos, turinčios nustatyto kampo rotoriu, schema

- rotoriaus apsisukimų skaičiaus per minutę (žym. RPM arba n)
- apsisukimo spindulio R (pateikiami centrifugos techniniame pase).

Kartais frakcionavimas aprašomas, nurodant centrifugos apsisukimų per minutę skaičių. Centrifugų labai skiriasi techniniai duomenys, rotoriaus spindulys, todėl šis dydis nerodo, kokia jėga dalelė buvo veikiama centrifugavimo metu. Norint gauti **atsirklojančius frakcionavimo duomenis**, reikia žinoti, kokių pagreičių (RCF = \times g) buvo veikiama dalelė centrifugavimo metu. RCF ir RPM lengva perskaičiuoti, žinant centrifugos rotoriaus spindulį. Šiuolaikinės centrifugos automatiškai atlieka šį perskaičiavimą. Tačiau turint senesnio modelio prietaisą, šiuos skaičiavimus nesunku atliliki patiemis:

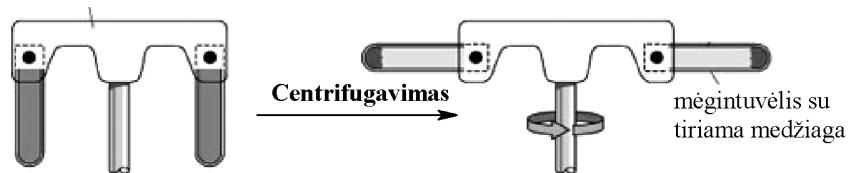
$$RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times R \times n^2, \text{ arba } RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times R \times (RPM)^2,$$

$$\text{taigi } RPM = \sqrt{\frac{RCF}{1,118 \times 10^{-5} \times R}} = 945,7 \sqrt{\frac{RCF}{R}}.$$

Čia R – centrifugos rotoriaus spindulys (cm), n – centrifugos apsisukimų skaičius per minutę (RPM).

Suspenduotos **centrifuginiuose mėgintuveliuose** dalelės dedamos į **centrifugos rotoriu**. Atsižvelgiant į centrifugos rotoriuje esančių mėgintuvelių padėtį, rotoriai skiriami į **vertikalius, nustatyto kampo ir nenustatyto kampo (swing-out)** rotorius. Dažniausiai naudojamos centrifugos, turinčios nustatyto kampo ir nenustatyto kampo (*swing-out*) rotorius (4.8, 4.9 pav.).

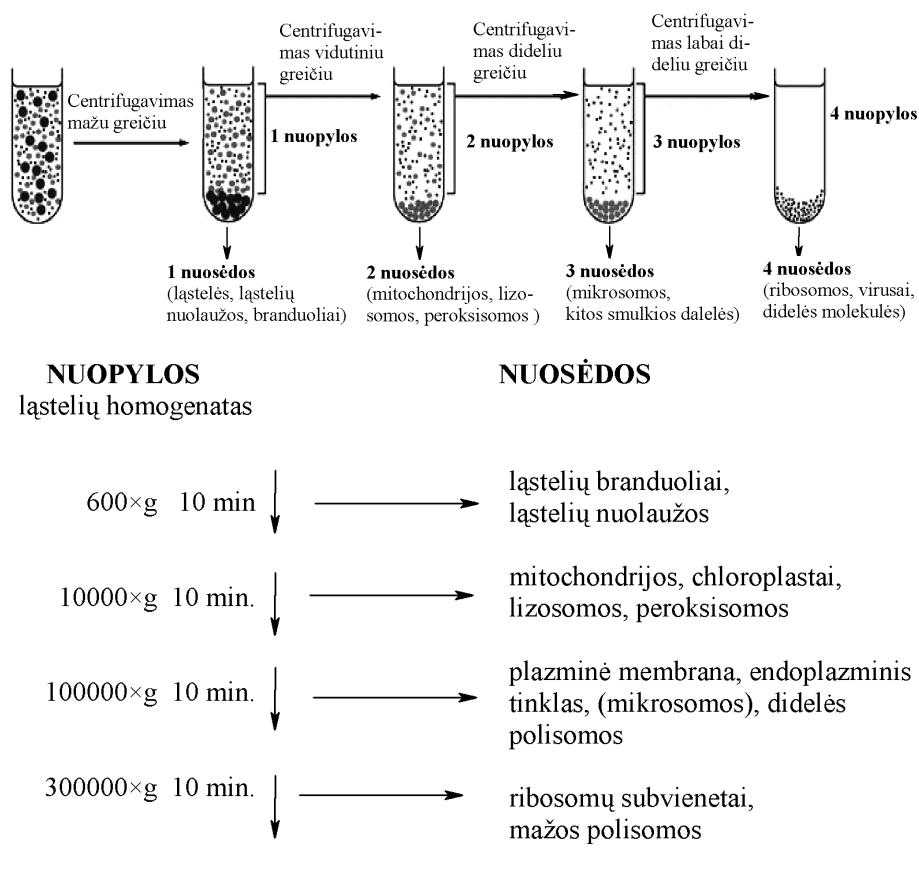
Atkreipkite dėmesį (4.6 pav.), kad, centrifuguojant nustatyto kampo rotoriumi, **nuosėdos** susidaro ant centrifuginio **mėgintuvėlio sienelės**, tuo tarpu po centrifugavimo nenustatyto kampo rotoriumi, **nuosėdos** surenkamos centrifuginio **mėgintuvėlio dugne**.



4.9 pav. Nenustatyto kampo (swing-arm) rotorius

4.5.1. Diferencinės centrifugavimasis

Dalelės frakcionuojamos, atsižvelgiant į dydį ir tankį. Keičiant centrifugos apsisukimų skaičių, rotoriaus spindulį, terpę tankę, galima išskirti atskiras ląstelės organeles.

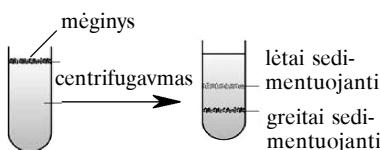


4.10 pav. Diferencinio centrifugavimo būdu galima frakcionuoti ląstelės organeles

4.5.2. Centrifugavimas tankio gradientu

Suspendavimo terpės klampumas lemia dalelės sedimentavimo greitį (4.6 pav.). Gradientas formuojamas iš CsCl, sacharozės, *Ficol*, *Percol* ir kitų medžiagų. Gradientą formuojančios medžiagos tankis turi būti mažesnis už sedimentuojančių dalelių tankį.

Gradientas gali būti **tolygus** arba **laiptinis**. Tolygus gradientas savaime susidaro, centrifuguojant klampų tirpalą arba specialiai supylant komponentus. Mažiausias tirpalo



4.11. Centrifugavimas tankio gradientu

tankis mëgintuvėlio viršuje, didžiausias – mëgintuvėlio dugne. Laiptinis gradientas sudaromas atsargiai vienas ant kito užlašinant skirtingo tankio tirpalus. Kartais taikoma vieno laiptelio tankio užtvara vienos rūšies dalelėms atskirti. Centrifuguojant tankio gradientu gauname atskiras **zonas** (4.11 pav.).

Zoninis centrifugavimas. Centrifuguojama dažniausiai mažu (5–20 %) sacharozės ar CsCl tankio gradientu. Mëginys atsargiai užlašinamas ant suformuoto gradienito. Vienodo **dydžio** ir **formos** dalelės po centrifugavimo sudaro zoną, jos sustoja, kai yra pusiausviros su terpe. Po centrifugavimo susidaro daug juostų, turinčių skirtinges masés ir dydžio daleles. Po centrifugavimo mëgintuvėlio dugnas praduriamas ir atsargiai surenkamos frakcijos.

Vienodo tankio (izopikninis) centrifugavimas. Centrifuguojama dideliame sacharozės arba CsCl tankio gradiente (20–70 %). Frakcionuojama atsižvelgiant į **dalelės tankį** (dalelių masę ir forma atskyrimui neturi įtakos). Mëginys atsargiai užlašinamas ant suformuoto gradienito. To paties **tankio** (*buoyant density*) dalelės po centrifugavimo sudaro zoną, dalelės „sustoja“, kai yra pusiausviros su gradienitu. Po centrifugavimo susidaro daug juostų, turinčių skirtingo tankio dalelių. Po centrifugavimo mëgintuvėlio dugnas praduriamas ir atsargiai surenkamos frakcijos.

Centrifuginiai mëgintuvėliai

Centrifuguojant frakcionuojama medžiaga būna suspenduota **centrifuginiuose mëgintuveliuose**. Labai svarbios centrifuginių mëgintuvėlių savybės – mëgintuvėlių talpa ir medžiaga, iš kurios pagaminti mëgintuvėliai. Mëgintuvėlių talpa lemia **didžiausią tirpalo tūri**, kurį galima mëgintuvėliuose centrifuguoti. Medžiaga, iš kurios pagaminti mëgintuvėliai, riboja centrifugavimo greitį ir taip pat centrifuguojamos medžiagos cheminę sudėtį. Yra keletas taisyklių, kurias žinant garantuojamas saugus darbas.

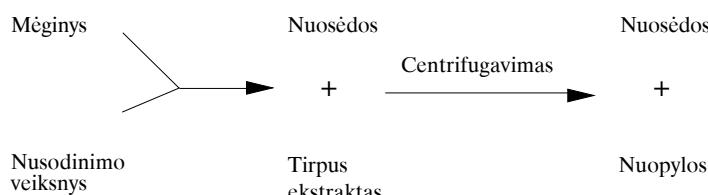
Paprasto stiklo (**Pyrex**) mègintuvèlai nerekomenduojami centrifuguojant didesnais nei **$2,000 \times g$** pagreièiais. **Corex** stikliniai mègintuvèliai tinkami naudoti iki **$15,000 - 18,000 \times g$** . Praktièkesni, nors ir mažiau inertiški, yra plastikiniai (polipropileno, polistireno) ir nitroceliulioziniai mègintuvèliai. **Polipropileniuose** mègintuvèliuose galima saugiai centrifuguoti iki **$20,000 \times g$** . Dauguma ultracentrifuginių mègintuvèlių pagaminti iš **nitroceliuliozès**. Jie nelabai brangùs ir gamintojai šiuos mègintuvèlius siûlo naudoti kaip vienkartinius. Lentelëje XX pateiki duomenys apie plastikinių mègintuvèlių tinkamumą centrifuguoti tam tikros cheminës sudëties tirpalus.

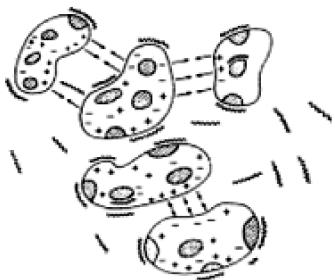
Saugaus darbo centrifugomis pagrindinës taisyklos:

- visi centrifugavimai didelio greičio centrifuga turi būti pažymëti centrifugos naudojimo žurnale. Prieš pradëdami darbą peržiûrekite žurnalo įrašus ir įsitikinkite, kad centrifugavimas duota centrifuga yra saugus – nepažeistas rotorius, néra pastabų apie gedimus;
- pradëdami centrifuguoti nežinoma centrifuga, pasitarkite su laborantu ar dëstytoju;
- centrifuga ijjunkite tik uždarę centrifugos dangtį;
- centrifuguoti galima tik taisyklingai subalansavus centrifuginius mègintuvèlius. Dažniausiai tokio pat svorio centrifuginiai mègintuvèliai dedami rotoriuje vienas prieš kitą. Bükite labai atidûs : $0,01g$ neatitiktis centrifuguojant $100000 \times g$ pagreièiu ekvivalentiška $1 kg$ neatitikciai;
- centrifuguodami sulaukite, kol centrifuga pasieks nustatyta greitij;
- po centrifugavimo išimkite rotorij. Išvalykite.

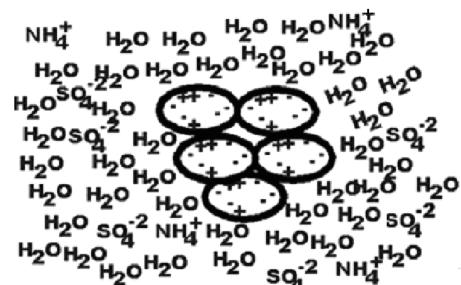
4.6. Nelastelinio ekstrakto frakcionavimo metodai

Ilgą laiką vienintelis bûdas išfrakcionuoti nelastelinius ekstraktus buvo **nusodinti** atskirus ekstrakto komponentus. Šiandien nusodinimas dažniausiai taikomas norint sukoncentruoti labai praskiestus vandeninius baltymų tirpalus.





4.12 pav. Baltymų nusodinimas organiniais tirpikliais



4.13 pav. Baltymų nusodinimas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Veiksniai, kurių poveikyje atskiro ekstrakto sudėtinės dalys tampa mažiau tirpios ir nusodinamos yra labai įvairūs: atšaldymas, ekstrakto pH ir joninės jėgos keitimasis, organiniai tirpikliai, imunoprecipitacija ir kt. Dažniausiai baltymai nusodinami organiniais tirpikliais (etanoliu, metanoliu, acetonu), druskomis (dažniausiai amonio sulfatu) ir trichloracto rūgštimi.

Mechanizmai, kurie lemia baltymų sulipimą (agregaciją) vandeniuose organinių tirpiklių tirpaluose labai įvairūs. Didžiausią įtaką turi tirpalo dielektrinės konstantos sumažėjimas.

Į nelastelinį tirpalą įpyles organinio tirpiklio, sumažėja tirpalo dielektrinė konstanta (H_2O dielektrinė konstanta – 78.5; metanolio – 32.6; etanolio – 24.3). Juo mažesnė tirpalo dielektrinė konstanta, juo lengviau skirtingai įkrautos molekulės sąveikauja viena su kita. Tokiu būdu molekulės sulimpa ir nusėda.

Su druskomis (pvz., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) baltymų nusodinimas vyksta pagal du mechanizmus. Pirmiausia, druskos anijonai baltymo molekulę daro mažiau tirpią dėl sąveikos su teigiamai įkrautomis aminorūgščių liekanomis. Ši sąveika daug veiksmingesnė, kai $\text{pH} < \text{pI}$. Antra, baltymo molekulės dehidratuojančios (4.6.2 pav).

Pridėtos į baltymo tirpalą druskos jonai hidratuojami. Mažėja „laisvo“ vandens kiekis ir baltymo molekulės dehidratuojamos. Baltymų paviršiuje esančios ir anksčiau uždengtos hidrofobinės „salelės“ gali tarpusavyje sąveikauti. Todėl baltymai sulimpa ir iškrenta nuosėdomis– **išsūdomi**.

4.6.1. Baltymų nusodinimas trichloracto rūgštimi (TCA)

Metodas naudinges, kai reikia sukonzentruoti praskiestus baltymo tirpalus. Jis taikomas, jai pavyzdžiuose baltymo koncentracija nemažesnė, nei $5\mu\text{g}/\text{ml}$.

Darbo eiga:

1. I balymo tirpalo įpilti 1/10 tūrio 100% ÖCA.
2. Inkubuoti leduose 30 min. arba 15 min., esant -20°C temperatūrai.
3. 5 min. centrifuguoti didžiausiu greičiu ependorfiniuose megintuvėliuose stalo centrifuga
4. .Pipete pašalinti nuopylas (supernatant¹).
5. Gautas nuosėdas galima:
6. Ištirpinti 50 – 100 µl 0,1 N NaOH.
7. Keletą kartų praplauti nuosėdas 1ml etanolis–eteris mišiniu (1:1 v/v) , norint visiškai pašalinti rūgštį, truputį padžiovinti ir ištirpinti norimame buferyje. Trichloracto rūgštis (TCA, CCl₃COOH M_r=163,39) laikoma tamsiame inde traukos sąlygomis. Ruošiant 100 ml 100% (w/w) tirpalo reikia 68,78 gramus rūgšties ištirpinti 31,22 ml distiliuoto vandens.

Remiantis Bollag, D.M., Edelstein, S.J. (1991). Protein Methods. Wiley-Liss, Inc., New York, p.72 -3.

4.6.2. Baltymu nusodinimas amonio sulfatu

Metodas taikomas daugiau kaip 130 metų. Anksčiau jis buvo vienas iš plačiausiai naudojamų baltymu **frakcionavimo būdų**. Šiuo metu metodas vertinamas kaip labai pigus baltymu **nusodinimo** būdas. Nusodinant baltymus gaunamas ir gryninimo poveikis, t. y. nusodinant baltymus iš lašelių ar audinių ekstraktų amonio sulfatu galima tikėtis gauti 2–10 kartų daugiau išotintus tiksliniu baltymu ekstraktus.

Amonio sulfato koncentracija tirpale reiškiama sotumo laipsniais arba sotumo procentais. Pavyzdžiu, 0,4 ir 0,6 atitinkamai 40% ir 60% yra santykiniai dydžiai, laikant kad 1,0 ir 100% atitinka visišką sotumą.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, M_m=132,1 g/M, sočiojo tirpalo koncentracija 4,1M (707 g l⁻¹). $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tirpumas beveik nesikeičia, keičiant temperatūrą nuo 0 iki 30 °C.

Nors literatūroje galima rasti duomenų apie amonio sulfato koncentracijas, kurioms esant baltymai iškrenta nuosėdomis, dažniausiai kiekvienu konkrečiu atveju „bandymų ir klaidų“ metodu yra parenkamos sąlygos.

4.3 lentelėje parodyti amonio sulfato kiekiai, reikalingi pasiekti 0–100% sotumus.

Amonio sulfato kiekj, reikalingą pasiekti atitinkamą sotumo laipsnį, galima apskaičiuoti iš formulės

$$x = \frac{0,515 \times V_1 \times (Pr_1 - Pr_2)}{1 - (0,272 \times Pr_2)},$$

kur x –amonio sulfato kiekis (g), reikalingas norint pasiekti Pr₂ sotumo laipsnį, V₁ – pradinio tirpalo tūris, Pr₁ – pradinio tirpalo sotumo amonio sulfatu laipsnis, Pr₂ – norimo tirpalo sotumo laipsnis.

4.3 lentelė. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kiekis (g l⁻¹) reikalingas norint pasiekti norimą sotumą (procenatais)

Galutinė koncentracija (%) → Pradinė koncentracija ↓	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	Pridėto amonio sulfato kiekis (g l ⁻¹)								
0	107	166	229	295	366	442	523	611	707
10	54	111	171	236	305	379	458	545	636
20	—	56	115	177	244	316	392	476	565
30	—	—	57	119	184	253	328	408	495
40	—	—	—	59	122	190	262	340	424
50	—	—	—	—	61	127	197	272	353
60	—	—	—	—	—	63	131	204	283
70	—	—	—	—	—	—	66	136	212
80	—	—	—	—	—	—	—	68	141
90	—	—	—	—	—	—	—	—	71

Naudojant sotujį amonio sulfato tirpalą reikalingas druskos tirpalo kiekis apskaičiuojamas iš formulės:

$$V_2 = \frac{V_1 \times (Pr_2 - Pr_1)}{1 - Pr_2},$$

kur V_2 – reikalingas sočiojo amonio sulfato tirpalo tūris (ml), V_1 – pradinis tirpalo tūris (ml), Pr_1 – pradinis sotumo laipsnis, Pr_2 – galutinis sotumo laipsnis. Čia Pr_1 ir Pr_2 sotumo laipsnis išreiškiamas trupmeniniu sotumo laipsniu – $S_f = 0,4 = 40\%$

Darbo eiga:

- Žinyne ar eksperimentiškai nustatyti kurio sotumo laipsnio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nusodina tikslinį balytymą.
- I balytimo tirpalą mažais kiekiais, maišant dėti reikiama kiekį $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- Nusodinimas pradedamas nuo didžiausios $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koncentracijos, kuriai esant tikslinis balytas dar neišsūdomas.
- Inkubuoti 30 min. nestipriai maišant, esant reikiama temperatūrai.
- Nuosėdas atskirti centrifuguojant.
- Jei nusodinimas laiptinis – i nuopilas dėti kitą porciją $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ir pakartoti 3–4 sk.procedūras.
- Nupilti nuopilas.
- Greitai centrifuguojant mègintuvélio dugne surinkti nuopilų likučius ir pašalinti pipete.
- Tikslinį balytymą ištirpinti reikiamame buferyje.

Pastabos

- Dažniausiai, kai amonio sulfato koncentracija mažesnė kaip 1 M (25% sočiojo) nusėda tik labai didelés dalelés, sulipę arba labai dideli balytmai. Nusodinant

laiptiskai dažniausiai naudojama ši amonio sulfato koncentracijų serija : 0 M; 1 M (25% sočiojo); 1,6M (40% sočiojo); 2,4M (60% sočiojo); 3,2M (80% sočiojo).

- I balyto tirpalą galima pridėti kristalinio amonio sulfato arba pilti sočiojo druskos tirpalą. Pirmasis būdas patogesnis, kai reikia pridėti didelius kiekius amonio sulfato ir nenorima labai padidinti pavyzdžio tūrio. Visais atvejais druska pridedama nepertraukiant maišymo, kad nesusidarytų sritys, turinčios didelę vietinę druskos koncentraciją.
- Juo didesnė tirpalo temperatūra, juo didesnė tikimybė balytmams denatūruoti. Dažniausiai išsūdymas atliekamas 0°C, tačiau $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stabilizuojant balytumus ir stabdo bakterijų augimą, todėl kai kada balytmui išsūdymas atliekamas 25°C.
- Atskiriant susidariusias nuosėdas nuo likusio tirpalo dažniausiai užtenka 10 min $6000 \times g$, 40°C centrifugavimo. Išsūdant balytumus iš daugiau praskiestų tirpalų ir naudojant didesnius druskos kiekius, kartais tenka centrifugoti didesniu greičiu ir ilgesnį laiką.

Kodėl amonio sulfatas, o ne NaCl?

- Išsūdymo poveikis priklauso ne tik nuo druskos koncentracijos, bet ir nuo tirpalo joninės jėgos. Dėl šios priežasties, esant vienodai molinei koncentracijai, polivalentiniai anijonai veiksmingesni nei monovalentiniai, o polivalentiniai katijonai trukdo išsūdymui. Taigi optimalus druskos derinys – polivalentinis anijonas su monovalentiniu katijonu.
- Maža amonio sulfato kaina.
- Išsūdymo poveikis mažėja eileje : **Citratas > Sulfatas > Fosfatas > Chloridas > Nitratas > Tiocianatas.** Šia tvarka mažėja druskų stabilizacinis poveikis ir didėja chaotropinės druskų savybės. Tuo būdu išsūdyti tinkamiausios druskos – citratai ir sulfatai.
- Sulfatai yra tirpesni (pvz., kambario temperatūros sąlygomis amonio citrato ir amonio sulfato sotieji tirpalai 2,5 l ir 4,1 l atitinkamai).
- NaCl tirpumas mažas.
- Stabilizuojantis poveikis, kurį druska (esant koncentracijai, didesnei kaip 0,5M) daro daugumai balytmui.

Sunkumai nusodinant balytumus amonio sulfatu.

1. Amonio jonai trukdo tiksliai įvertinant nuosėdose balytumo kiekį Bredfordo, Louri metodais.
2. Išsūdomi ne tik balytmai, bet ir kitos medžiagos, pvz., detergentai. Tween 20 ir Triton X100 pradeda nusėsti, kai amonio sulfato koncentracija šiek tiek didesnė kaip 1 M. Susidariusių agregatų tankis mažesnis nei druskos tirpalui, todėl centrifuguojant šie agregatai “pakyta”, kartu nusinešdami ir dalį balytmui.

3. Baltymų, kurių veikimui reikalingas Ca^{2+} , negalima nusodinti amonio sulfatu, nes kalcio sulfatas netirpus.

4.6.3. Baltymų nusodinimas etanoliu

Metodas dažnai taikomas sukoncentruoti labai praskiestus vandeninius baltymų tiraplus.

1. Dėti 9 tūrius atšaldyto 100 % etanolio į 1 tūri praskiesto baltymo tirpalo.
2. Sumaišyti tirpalus.
3. Palikti mažiausiai 60 min. -20°C (dažniausiai tokie tirpalai paliekami per naktį).
4. Centrifuguoti 15 min. 4°C didžiausių pagreičių ($\geq 15000 \text{ g}$)
5. Pašalinti nuopilas, nusausinti nuosėdas (apvertus mėgintuvėlį ant filtravimo popieriaus).
6. Nuosėdas perplauti 70 % atšaldytu etanoliu (-20°C). Sumaišyti, 5 min. centrifuguoti didžiausių pagreičių (15 000 g).
7. Nuosėdas padžiovinti kambario temperatūroje arba *speed-vac* centrifugoje.
8. Ištirpinti nuosėdas norimos sudėties buferyje.

4.6.4. Baltymų nusodinimas parūgštintu acetонu ir metanoliu:

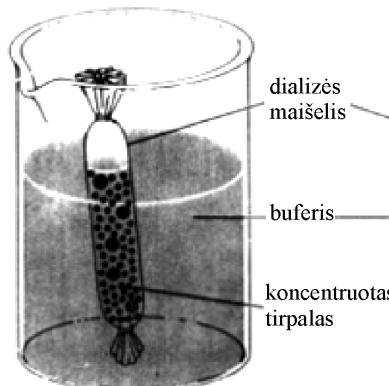
1. Paruošti parūgštintą acetoną: sumaišyti 120 ml acetono ir 10 μl HCl (HCl koncentracija 1 mM).
2. Paruošti nusodinimo reagentą: sumaišyti lygius tūrius (1:1, v/v) parūgštinto acetono ir metanolio. Laikyti -20°C .
3. Sumaišyti 1 tūri praskiesto baltyminio tirpalo su 4 tūriais nusodinimo reagento.
4. Palikti -20°C bent valandą. Galima laikyti per naktį.
5. Centrifuguoti 4°C 15 min. didžiausių pagreičių ($\geq 15000 \text{ g}$).
6. Atsargiai nupilti nuopilas. Nusausinti mėgintuvėlį ant filtravimo popieriaus.
7. Nuosėdas padžiovinti *speed-vac* centrifugoje arba kambario temperatūros sąlygomis.
8. Ištirpinti nuosėdas norimos sudėties buferyje.

4.6.5. Dializė

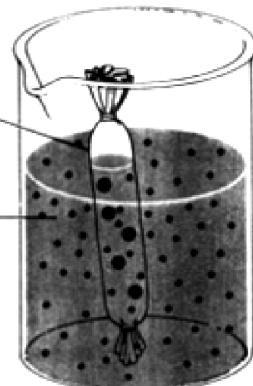
Po nusodinimo amonio sulfatu ir ištirpinus pasirinktame buferyje iš tirpalų turi būti pašalinta druska. Vienas iš būdų tai padaryti – dializuoti tirpalą prieš buferį, kurio druskų koncentracija maža. Dializuojant tirpalus galima :

- sumažinti druskos koncentraciją tirpale;
- gauti kitos sudėties baltymų tirpalą;
- iš dializuojamų tirpalų pašalinti detergentus, polisacharidus.

a) dializės pradžia



b) pusiausvyra



4.14 pav. Dializės schema

Koncentruotas baltymų tirpalas dializės maišelyje (dializės maišelio membranos poros neleidžia baltymams pasklisti tirpale) dedamas į didelį tūri buferio, kurio druskų koncentracija maža ir maišant laikomas ilgą laiką (16 – 24 val) (4.12 pav.). Per šį laiką tirpalas dializės maišelyje susilygsvarina su buferiu – druskos koncentracija tirpale sumažėja. Kai šis pusiausvirinimo procesas pakartojamas keletą kartų – pakeičiant pusiausvirinimo buferį – pasiekiamas dializės tikslas – sumažinama druskos koncentracija baltymo tirpale.

Kartais dializės metu dalis baltymų iškrenta nuosėdomis. Dėl šios priežasties dializuotas tirpalas dažniausiai centrifuguojamas, pašalinamos nuosėdos, kad jos netrukdytų vėlesnėmis frakcionavimo stadijomis.

Pastabos

- Dializės maišelio parinkimas. Dializės maišeliai – tai cilindriškos porėtos membranos. Šių porų dydis lemia molekulių, kurios pereina membraną dydį. Dažniausiai gaminamos membranos, kurių poros praleidžia molekules, mažesnėms už 5 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 100 kDa. Taigi, dializei parinkus membraną pralaidžią molekulėms mažesnėms už 30 kDa, visos nedidelės molekulės, tame tarpe ir maži baltymai, pasklis dializės buferyje – maišelyje liks baltymai ir molekulės, kurių dydis didesnis kaip 30 kDa.
- Tinkamo dydžio dializės maišelio parinkimas. Maišelis parenkamas tokio dydžio, kad maždaug trečdalies maišelio tūrio liktų nepripildyta dializuojamo tirpalu. Dializuojant didelės druskos koncentracijos tirpalus ir naudojant nedidelės joninės jėgos pusiausvirinimo tirpalus, esant netinkamam maišelio dydžiui, osmosinės jėgos gali suplešyti maišelį.

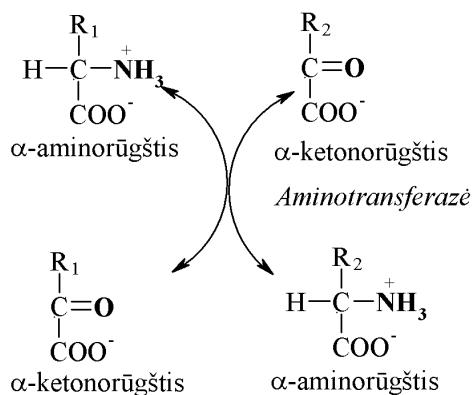
- Maišelio vienas galas užspaudžiamas spaustuku (arba užrišamas siūlu), atsargiai pripildomas dializuojamo tirpalo (vengiama įleisti oro burbuliukų), spaustuku uždaromos kitas maišelio galas (arba užrišamas siūlu) ir dializės maišelis dedamas į pusiausvirinimo buferį.
- Pusiausvirinamojo buferio tūris turi būti bent 100 kartų didesnis už dializuojamo tirpalo tūrį. Dializė dažniausiai atliekama 4°C, taigi buferis prieš darbą irgi turi būti atšaldytas. Lėtai maišant dializė atliekama 12 – 16 val. keletą kartų pakeičiant buferį.
- Po dializės maišelis atsargiai išimamas, atidarius vieną maišelio galą atsargai turinys perkeliamas į centrifuginį mėgintuvėlį.
- Parduodami dvejopį dializės maišeliai: sausū ar įdėti į tirpalą, džniausiai 25 % etanolio. Sausos membranos prieš darbą turi būti paruoštos.

Dializės maišelių paruošimas

- Išvirinti maišelius dideliame tūryje 2% (w/v) natrio karbonato ir 1 mM EDTA pH 8,0 tirpalo.
- Gerai praplauti distiliuotu vandeniu.
- Virinti 10 min 1mM EDTA (pH 8,0).
- Atšaldyti tirpalą. Perkelti maišelius į 25% EtOH ir laikyti 4°C iki prieiks.
- Prieš naudojimą gerai praplauti distiliuotu vandeniu.

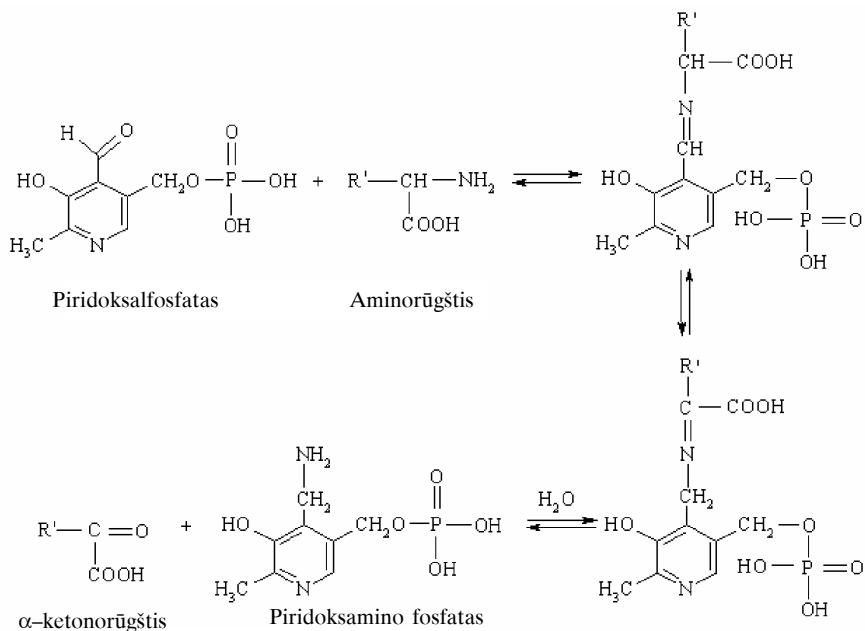
4.7. Peramininimas

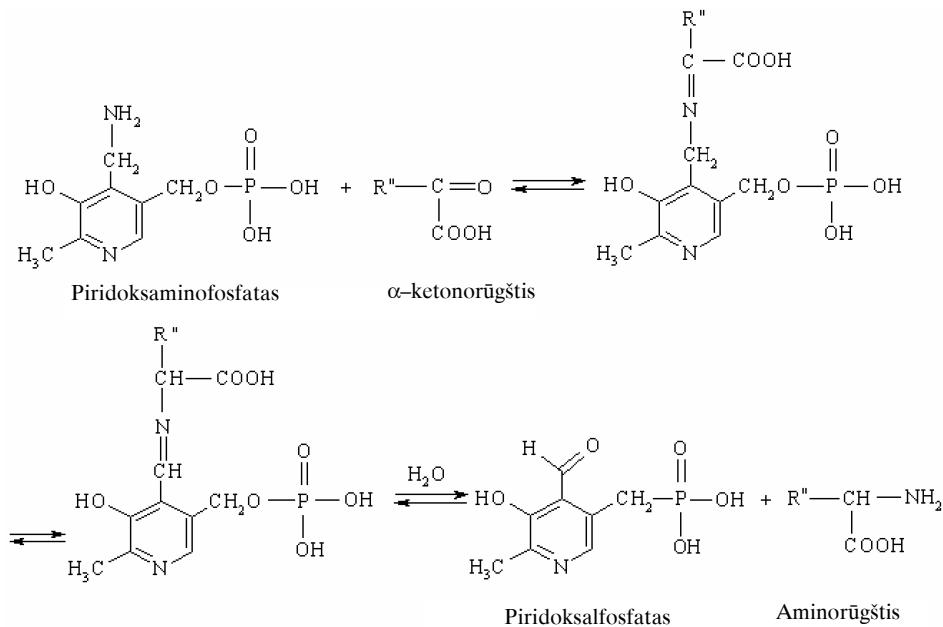
Peramininimo reakcija plačiai paplitusi audiniuose. Beveik visos aminorūgštys įtraukiamos į šias reakcijas. Ypač greitai peramininimo reakcijos vyksta dalyvaujant dikarboksiaminorūgštims (glutamo ir asparto) arba jas atitinkančioms α -ketonorūgštims (α -ketoglutaro ir oksalatacto). Azoto apykaitos procesuose didžiausią įtaką turi peramininimo reakcija - aminorūgščių sintezės ir skilimo reakcija. Oksidazės, katalizuojančios oksidacinių aminorūgščių deamininimą iki amoniako ir α -keto rūgščių, fiziologinėmis sąlygomis labai neaktyvios. Šių fermentų pH optimumas yra šarminis. Todėl aminorūgštys, patekusios į organizmą su maistu ir nesunaudotos baltymu ir kitu medžiagų sintezei, deamininamos netiesioginiu būdu. Iš pradžių jos dalyvauja peramininimo reakcijoje su α -ketoglutaro rūgštimi. Susidariusi glutamo rūgštis, veikiant labai aktyviam fermentui glutamato dehidrogenzei, netenka amoniako ir virsta α -ketoglutaro rūgštimi. Šis procesas yra grįztamas, todėl amoniakas žinduolių audiniuose gali virsti aminorūgštis. Veikiant glutamato dehidrogenzei, vyksta atvirkštinė reakcija – α -ketoglutaro rūgšties amininimas. Susidariusi glutamo rūgštis peramininimo metu perduoda azotą kitoms aminorūgštims. Būtent peramininimo metu ir susidaro tam tikros aminorūgštys, esant organizme pakankamam atitinkamų α -ketonorūgščių kiekiui, bei paruošiamas aminorūgščių anglies griaučiai skaidyti.



Substratais peramininimo reakcijos metu gali būti ne tik dikarboksiaminorūgštys arba dikarboksiketonorūgštys. Galimos peramininimo reakcijos ir tarp monokarboksiaminorūgščių, ir monokarboksiketonorūgščių. **Peramininimo reakcija** yra grižtamoji fermentinė reakcija, kurios metu aminorūgšties aminogrupė pernešama ant α -ketonorūgšties.

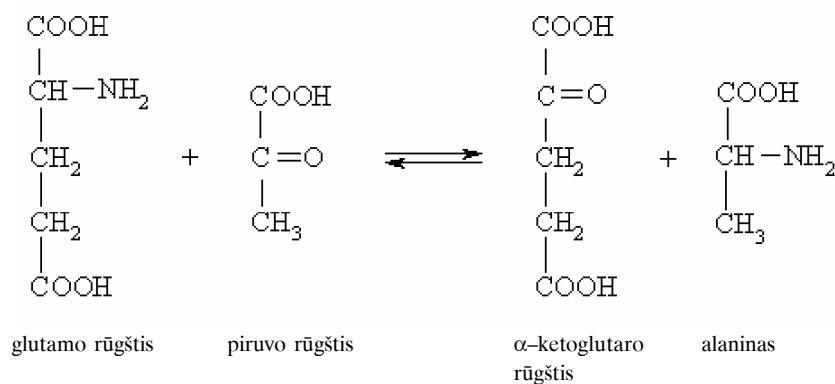
Fermentai, katalizujantys šią reakciją, vadinami **aminotransferazėmis**, arba **trans-aminazėmis**. Tai sudėtingi balymai, turintys kovalentiniu ryšiu, prie aminorūgšties lizino ε-aminogrupės prijungtą kofermentą piridoksalfosfata. Piridoksalfosfatas fermentinės reakcijos metu reaguoja su aminorūgtimi ir virsta piridoksmaminofosfatu, kuris atiduoda aminogrupę α -ketonorūgščiai, o pats vėl virsta piridoksalfosfatu. Šio proceso schema:

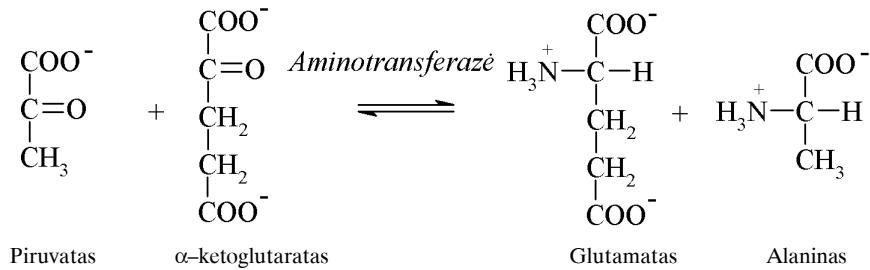




Piridoksalfosfatas – ne tik aminotransferazi, bet ir daugelio kitų fermentų (dekarboksilazių), katalizuojančiu tam tikrus aminorūgščių katabolizmo procesus, kofermentus. Reakcijų kryptį ir fermentų veikimo savitumą visada lemia baltyminė fermento dalis.

Su peramininimo procesu galima susipažinti, nagrinėjant glutamo ir pirovo rūgščių peramininimą, dalyvaujant raumenų aminotransferazei.





Apie reakcijos intensyvumą galima spręsti iš alanino daugėjimo ar glutamo rūgšties kiekio mažėjimo. Šie pokyčiai kokybiskai matomi atliekant popieriaus chromatografiją.

Medžiagos ir reagentai:

1. Triušio raumenys (triušio raumenys 1,5 – 2,0 g) susmulkinami žirklėmis ir/arba skalpeliu, po to sutrinami porceliano lėkštelėje, pridedant nedidelį kiekį smėlio).
 2. 1,0 % glutamo rūgšties tirpalas.
 3. 1,0 % alanino tirpalas.
 4. 1,0 % piruvo rūgšties tirpalas.
 5. 0,025 % monobromacto rūgšties tirpalas.
 6. 0,1 % KHCO_3 tirpalas.
 7. 10,0 % trichloracto rūgšties tirpalas.

Darbo eiga:

1. Į du mègintuvèlius į pilama po 0,5 ml glutamo rûgsties ir po 0,5 ml pirovo rûgsties. Į kiekvieną iš šių mègintuvèli pridedama po 1 ml 0,1% KHCO₃ (pH optimumui sudaryti) ir po 0,25 ml 0,025% monobromacto rûgsties (glikolizei sustabdyti).
 2. **Į pirmajį** mègintuvèli (**kontrolinis mègintuvèlis**), į pilama 2 ml 10% trichloracto rûgsties.
 3. Į abu mègintuvèlius pridedama po 500 mg triušio raumenų tyrelès.
 4. Abu mègintuvèliai inkubuojami 0,5 val. termostate (37°C).
 5. Po 0,5 val inkubacijos **į antrajį mègintuvèli** dedama 2 ml trichloracto rûgsties (fermentams inaktyvinti).
 6. Abiejų mègintuvèlių turiniai filtruojami ir filtratai tiriami popieriaus chromatografijos metodu.

Chromatografijos eiga

1. Ant chromatografinio popieriaus starto linijos viename taške užlašinama keletas lašų iš pirmojo mėgintuvėlio (kontrolė), kitame - iš antrojo mėgintuvėlio. Starto linijoje užlašinami ir kontrolinių aminorūgščių alanino ir glutamo rūgšties tirpalai.



2. Kylamosios popieriaus chromatografijos sistema: izopropilo alkoholis: amoniakas: vanduo (7:1:2) 15 – 18 val (per naktį).
3. Chromatogramma išdžiovinama, apipurškiama 0,1% ninhidrino tirpalu acetone ir džiovinama 50°C temperatūroje. Aminorūgščių vietas chromatogramoje nusidažo violetine spalva.
4. Apskaičiuojamas kiekvienos aminorūgštis pasiskirstymo koeficientas ir sprendžiama apie peramininimo reakcijos eigą.

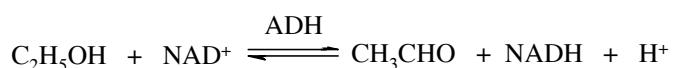
Kontroliniai klausimai :

1. Pakeičiamosios ir nepakeičiamosios aminorūgštys.
2. Amoniako pašalinimo keliai.
3. Piridoksalfosfato veikimo mechanizmas.

4.8. Alkoholio dehidrogenazės (ADH) išskyrimas iš kepimo mielių

Tikslas: išgryniinti alkoholio dehidrogenazę iš kepimo mielių ir nustatyti tam tikras fermento charakteristikas

Alkoholio dehidrogenazė (ADH) katalizuoją šią reakciją:



Alkoholio dehidrogenazė (EC 1.1.1.1) yra oksidoreduktazė (katalizuoją oksidacijos–redukcijs reakcijas). Mielių ADH molekulinė masė yra 141 kDa. Fermento molekulė sudaryta iš 4 subvienetu, ji turi 4 tvirtai surištus Zn atomus. Kiekvienas fermento subvienetas turi po dvi SH- grupes. Žinoma, kad aktyviame fermento centre yra histidino liekana. Mielių lastelėse reakcijos pusiausvyra yra nukreipta acetaldehydo redukcijos iki etanolio kryptimi.

pH optimumas: etanolio oksidacija optimaliai vyksta pH 8,6–9,0.

Fermento aktyvlikliai: merkaptoetanolis, ditiotreitolis, sunkiuosius metalus su-rišantys junginiai.

Substratinis savitumas: pirmniai alkoholiai daug geresni substratai nei antriniai ar šakotosios grandinės aktyviam fermento centre yra His liekana. Mielų ląstelėse reakcijos pusiausvyra yra nukreipta acetaldehido redukcijos iki etanolio kryptimi.

Inhibitoriai (slopikliai): sunkieji metalai ir -SH junginiai.

Stabilizatoriai: praskiesti fermento preparatai stabilizuojami pridedant serumo albumino, želatinos ir/ar cisteino arba glutationo. Koncentruoti fermento tirpalai net vandenye stabilūs keletą dienų 5°C. Jei pH mažesnis kaip 6,0, taip pat jei pH didesnis už 8,5, fermentas labai nestabilus. Liofilizuoti fermento preparatai laikomi 2–8 °C, išlieka stabilūs 6–12 mėnesių.

Reakcijos greitis nustatomas matujant NADH koncentracijos didėjimą. Tai patogu atlikti matujant spektrofotometrijos būdu šviesos sugerčią (absorbciją) esant šviesos bangos ilgiui $\lambda = 340$ nm.

Medžiagos ir reagentai:

1. Džiovintos kepimo mielės, 100g.
2. 0,066 M K₂HPO₄ – 300 ml.
3. 1 mM kalio fosfatinis buferis (pH 7,5) –1000 ml.

4.8.1. Alkoholio dehidrogenazės gryninimas

1. Džiovintos kepimo mielės užpilamos 300 ml 0,066 M K₂HPO₄ tirpalui ir **maišant** inkubuojamos 2 val. 37°C. Vyksta ląstelių autolizė.
2. Suspensija paliekama stoveti 3 val. kambario temperatūros sąlygomis. Taip balytmai ištirpsta.
3. 30 min. centrifuguojama 600 × g 4°C.
4. Nuosėdos išmetamos, o **nuopilos** (supernatantas) vandens vonioje pakaitinamos 15 min. 55°C.
5. Suspensija staigiai atšaldoma leduose iki 0 – 4°C.
6. Suspensija centrifuguojama 20 min. 6000 × g 4°C.
7. Nuosėdos išmetamos, o **nuopilos** šaltame kambaryje ar šaldytuve (4°C) gali būti paliekamos per naktį. Padedame 100 µl šio tirpalio fermento aktyvumo ir balytų kiekiui nustatyti (**I frakcija**).
8. I gautą nuopilą mažomis porcijomis, maišant, pilamas atšaldytas (-10–15°C) acetonas. Nuopilų ir acetono tūrių santykis 1:0,5. Svarbu, kad suspensijos temperatūra būtų ne didesnė, kaip -2°C.
9. Mišinys centrifuguojamas 15 min. 6000 × g 0°C.
10. Nuosėdos išmetamos, o i **nuopilas** dar pilama atšaldyto atsetono. Nuopilų ir acetono tūrių santykis 1:0,6.

11. Mišinys centrifuguojamas 15 min. $6000 \times g$ 0°C .
12. Nuopilos pašalinamas, o **nuosédos** suspenduoojamos 25 ml 1 mM kalio fosfatiname buferyje, pH 7,5. Padedame 100 μl šio tirpalо fermento aktyvumui ir balytmų kiekiui nustatyti (**II frakcija**).
13. Suspensija dializuojama 3 val. 4°C prieš 0,5 litro 1 mM kalio fosfatinio buferio (pH 7,5), kas valandą keičiamas buferis.
14. Dializuota suspensija centrifuguojama 15 min. $15000 \times g$ 4°C .
15. Nuosédos pašalinamos, o i **nuopilas** (**III frakcija**), létai maišant 4°C , dedama amonio sulfato. (Prieš tai atidedame 100 μl III frakcijos tirpalо fermento aktyvumui ir balytmų kiekiui nustatyti). I 10 ml nuopilų dedama 3,6 g amonio sulfato.
16. Po 20 min. inkubacijos centrifuguojama 20 min. $15000 \times g$ 4°C .
17. **Nuosédos** tirpinamos 5 ml dejonizuoto vandens (**IV frakcija**: padedame 100 μl šio tirpalо fermento aktyvumui ir balytmų kiekiui nustatyti), pridedama 1g amonio sulfato.
18. Po 20 min. inkubacijos centrifuguojama 20 min. $15000 \times g$ 4°C .
19. I **nuopylas** (**V frakcija** : atidedame 100 μl šio tirpalо fermento aktyvumo ir balytmo kieko nustatymui), létai maišant dedama amonio sulfato iki 0,6 soties.
20. Po 20 min. inkubacijos centrifuguojama 20 min. $15000 \times g$ 4°C .
21. **Nuosédos** tirpinamos 1 ml dejonizuoto vandens (**VI frakcija**).

Pamatuojamas kiekvienos frakcijos tūris, pamatuojama balytmo koncentracija, nustatomas fermentinis aktyvumas.

4.8.2. Balytmo kieko nustatymas frakcijose

Visose frakcijose pamatuojame balytmo koncentraciją. Balytmų koncentracijos nustatymas Bredfordo metodu aprašytas 5.5.2. skyriuje.

4.8.3. Fermento aktyvumo nustatymas

Pamatavus šviesos sugertį tam tikru laiko momentu, galima apskaičiuoti NADH koncentraciją reakcijos mišinyje tuo laiko momentu. Atsižvelgiant į Bero–Lamberto dėsnį, sugertį su medžiagos koncentracacija sieja ši priklausomybė:

$$A = \dot{a}_M \times c \times l,$$

kur A – sugertis, esant $\ddot{\epsilon} = 340 \text{ nm}$, ϵ_M – molinės ekstinkcijos koeficientas ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c – koncentracija (M), l – šviesos nueitas kelias tirpale (cm).

NADH atveju $\epsilon_M = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Taigi NADH koncentracija apskaičiuojama pagal formulę:

$$c = A / \epsilon_M \times l$$

Alkoholio dehidrogenazės aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris redukuoja 1 μmol NAD⁺ per 1 min. įprastinėmis sąlygomis.

Savitasis fermento aktyvumas išreiškiamas aktyvumo vienetais vienam mg balytumo (U/mg).

Reagentai:

1. 100 mM TRIS-HCl buferis, pH 8,8 .
2. 25 mM kalio fosfato buferis pH 7,5.
3. 1 mg/ml NAD⁺ (tirpinama 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5.
4. 3 M etanolis.

Darbo eiga:

1. Į spektrofotometro kiuvetę įpilama: 2,8 ml TRIS-HCl buferio pH 8,8 ; 0,1 ml (100 μl) 3 M etanolio ir 0,1 ml (100 μl) NAD⁺ ir gerai išmaišoma.
2. Kiuvetė dedama į spektrofotometro šulinėlį ir prietaisas kalibruojamas taip, kad rodytu optinį tankį, lygū 0 , esant bangos ilgiui $\lambda = 340 \text{ nm}$.
3. Įpilama 10 – 50 μl fermento tirpalo (I–VI frakcijos) ir išmatuojamas optinio tankio pokytis kas 30 sek 2min. laikotarpiai.
4. Ivertinamas pradinis fermentinės reakcijos greitis ir apskaičiuojamas savitasis aktyvumas.
5. Savitasis aktyvumas išreiškiamas susidariusio per 1 min. NADH kieko mikromoliais, skaičiuojant mg balytumo:

$$\text{vnt/mg}\cdot\text{balytmo} = \frac{\Delta A_{340/\text{min}}}{6,22 \times \text{mg}\cdot\text{balytmo}/\text{ml}}.$$

Fermento gryninimo rezultatai pateikiami lentelėje (4.4 lentelė)

4.4 lentelė. Alkoholio dehidrogenazės gryninimo eiga

Eilės Nr.	Gryninimo Stadija	Bendras tūris /ml/	Bendras balytmo kiekis /g/	Savitasis aktyvumas vnt/mg	Bendras aktyvumas	Išgryniimas	Fermento išeiga
1	I frakcija						
2	II frakcija						
3	III frakcija						
4	IV frakcija						
5	V frakcija						
6	VI frakcija						

Kontroliniai klausimai :

1. Alkoholio dehidrogenazės savitumas.
2. Alkoholio dehidrogenazės struktūra.
3. Fermentų aktyvumo vienetai.
4. Fermentų gryninimo metodai.

5. Šviesos sugertis

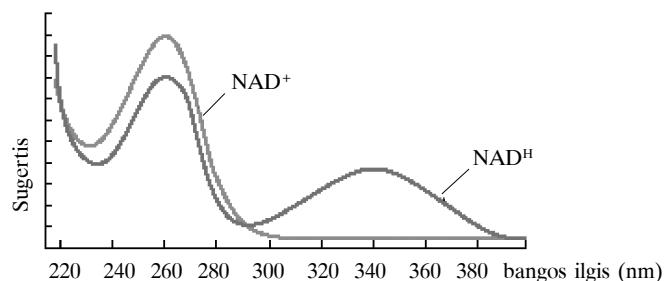
5.1. Šviesos sugerties prigimtis

Šviesos sugerties prigimtį patogu aiškinti remiantis kvantinėmis šviesos savybėmis. Sklindant šviesai medžiaga įprastinėmis sąlygomis šviesos intensyvumas mažėja, nes šviesos kvantai (fotonai) sukelia medžiagą sudarančių dalelių šuolius iš mažesnės į didesnės energijos lygmenis. Po dalelės sąveikos su fotonu ji persoka į aukštesnį energijos lygmenį ir būna sužadinta, o fotonas išnyksta. Sužadintos būsenos dalelė gyvuoja neilgai. Ji atiduoda sužadinimui išeikvotos energijos dalį ir persoka į žemesnį lygmenį. Jeigu tokio šuolio metu yra išspinduliuojamas fotonas, tai dalelei sužadinti sunaudota energija vėl virsta fotono energija. Tačiau dažniausiai sužadinimo energija, dalelei peršokant iš aukštesniojo lygmens į žemesnijį, virsta kitomis energijos rūšimis, pavyzdžiui, šilumine, dėl to mažėja medžiaga sklindančios šviesos intensyvumas.

Šviesos, sklindančios per medžiagą intensyvumo mažėjimas, vadinamas šviesos sugertimi. Jei sugeriamas regimosios arba ultravioletinės spektro dalies šviesa, tai sužadinami elektronai peršoka į aukštesnį lygmenį, o vėliau grįžta į žemesnį lygmenį.

Medžiagos nevienodai sugeria skirtingų bangos ilgių šviesą. **Medžiagos sugerties priklausomumas nuo bangos ilgio vadinamas medžiagos sugerties spektru.**

Vanduo nesugeria nei regimosios, nei ultravioletinės spektro dalies šviesos. Daugelio medžiagų tirpalai (pvz. hemoglobino, citochromo c) yra spalvoti, nes jų molekulės sugeria regimą šviesą. Pavyzdžiui, redukuotas citochromas cyra geltonas, jo sugerties max yra 550 nm ir 420 nm – tai lemia hemo prostetinė grupė, kuri yra chromoforas (spalvos nešiklis). Kitos medžiagos – nukleorūgštys, balytmai, NAD(H) sugeria ultravioletinę šviesą. NADH ultravioletinės šviesos sugerties maksimumas yra ties 260 nm ir 340 nm, o NAD⁺ – tik ties 260 nm. Fermentų, pvz., nuo NAD priklausomų dehidrogenazių aktyvumas gali būti vertinamas atsižvelgiant į šviesos sugerties kitimą ties 340 nm.



5.1 pav. NAD⁺ ir NADH optinio tankio priklausomumas nuo bangos ilgio λ

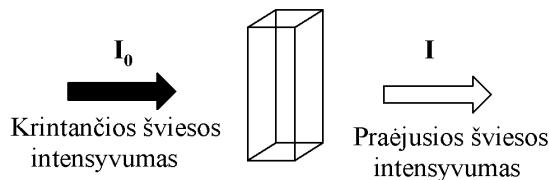
Bangos ilgis ties kuriuo yra didžiausias optinis tankis vadinamas λ_{max} . Medžiaga gali turėti keletą sugerties maksimumų. Tuomet žymime $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ir t. t.

Junginių sugerties spektrai gali būti vartojami jiems nustatyti.

5.2. Kiekybiniai matavimai. Bero ir Lamberto dėsnis.

Įsivaizduokime NADH tirpalą spektrofotometro kiuvetėje (plotis 1 cm). Pro jį yra leidžiama 340 nm monochromatinė ultravioletinė šviesa.

Tegu krintančios šviesos intensyvumas = I_0 , o praėjusios šviesos intensyvumas = I



Šviesos intensyvumą medžiagoje apibūdina **šviesos pralaidumas T**. Jis lygus pro medžiagą praėjusios ir į medžiagą kritusios šviesos intensyvumų santykui:

$$T = \frac{I}{I_0}.$$

Dažnai šviesos pralaidumas išreiškiamas procentais:

$$T' = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

Šviesos pralaidumas priklauso nuo kiuvetėje esančio tirpalo koncentracijos, tirpalo sluoksnio storio ir šviesos bangų ilgio.

Šviesos pralaidumui atvirkštinio dydžio dešimtainis logaritmas vadinamas optiniu tankiu A:

$$A = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I}$$

5.1 lentelė. Šviesos pralaidumo ir optinio tankio santykis

Krintančios šviesos intensyvumas (I_0)	Praėjusios šviesos intensyvumas (I)	Pralaidumas (T) procentais $\frac{I}{I_0}$	Optinis tankis (A) $\lg \frac{I_0}{I}$
100	100	100%	0
100	50	50%	0,3
100	10	10%	1.0
100	1	1%	2.0

- Tirpalo optinis tankis yra **tiesiog proporcingsas medžiagos, kuri sugeria šviesą, koncentracijai** (pavyzdžiu, optinis tankis yra tiesiog proporcina NADH koncentracijai).
- Optinis tankis taip pat **yra tiesiog proporcingsas šviesos nueitam keliui per mėginį, t. y. spektrofotometro kiuvetės pločiui.**
- **Ekstinkcijos koeficientas ϵ** rodo tirpalo optinio tankio santykį su medžiagos koncentracija ir tirpalo sluoksnio storiju (t. y. šviesos nueitu pro tirpalą keliu).
- **Molinis ekstinkcijos koeficientas ϵ_M** . Jeigu medžiagos koncentracija yra vienas molis/litre (molinė), tuomet ekstinkcijos koeficientas vadinamas molinis ekstinkcijos koeficientas ir žymimas ϵ_M .

Tiriamos medžiagos kiekį tirpale galima nustatyti matuojant optintinį tankį ties λ_{\max} ir taikant **Bero ir Lamberto** dėsnį.

$$A = \epsilon_M \times c \times l;$$

čia A = optinis tankis,

c – koncentracija (mol/litre),

l – kelio ilgis (kiuvetės plotis) (cm)

ϵ_M – molinis ekstinkcijos koeficientas.

ϵ_M vienetai yra $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (t. y. litrai \times mol $^{-1}$ \times cm $^{-1}$). NADH ϵ_M reikšmė yra 6220 $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

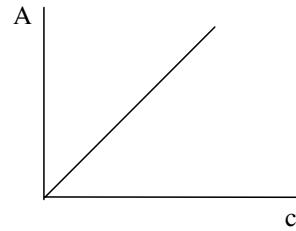
Bero ir Lamberto dėsnį galima pateikti grafiškai kaip tiesinė priklausomybė A nuo c.

Esant $A > 1$, optinio tankio priklausumumas nuo koncentracijos pasikeičia, pasidaro nebe tiesinis. Kintant bangos ilgiui į, molinės ekstinkcijos koeficientas kinta, todėl Bero ir Lamberto dėsnis galioja tik monochromatinei šviesai. Daugumos gamtinėų medžiagų ϵ_M galima rasti žinyruose arba juos galima nustatyti matuojant tikslios koncentracijos grynosios medžiagos tirpalooptinių tankių. Žinant medžiagos ϵ_M , lengvai galima nustatyti jos koncentraciją tirpale, matuojant tirpalo optinį tankį. Pavyzdžiu, aminorūgšties triptofano tirpalo optinis tankis ties 280 nm 1 cm kiuvetėje yra 0,167. Triptofano ϵ_M ties 280 nm yra $5580 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$:

$$A = \epsilon_M \times c \times l$$

Pertvarkius lygtį gaunama:

$$C = A / \epsilon_M \times l$$



5.2. pav. Optinio tankio priklausumumas nuo medžiagos koncentracijos

Taigi:

$$C = 0,167/5580 = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

Medžiagų spektrines savybes keičiantys veiksniai. Tos pačios medžiagos λ_{\max} ir ϵ_M gali skirtis – tai priklauso nuo sąlygų – tirpalo pH, tirpiklio poliaringuo ir kt.

Tirpalų optinį tankį galima pamatuoti spektrofotometru arba fotokolorimetru. Spektrofotometras yra naudojamas tirpalo optinio tankio matavimui ties tiksliu bangos ilgiu. Fotokolorimetras yra paprastesnis instrumentas. Naudojant šviesos filtrus galima pamatuoti tirpalo optinį tankį platesnėje spektro dalyje (t. y. žalios, raudonos, mėlynos regimosios šviesos spektro srityse).

Praktiški patarimai matuojant optinį tankį:

1. Spektrofotometro kiuvetės būna pagamintos iš stiklo (paprasto arba kvarcinio) arba plastiko. Matuojant tirpalo optinį tankį regimosios šviesos srityje, galima naudoti visų rūšių kiuvetes. Tačiau matuojant optinį tanką ultravioletinėje šviesoje, kai bangos ilgis **trumpesnis kaip 300 nm**, galima naudoti tik kiuvetes pagamintas iš **kvarcinio stiklo**. Kiuvetės turi būti gerai išplautos. Daugelis medžiagų (baltymai, nukleorūgštys) adsorbuojasi ant vidinio kiuvečių paviršiaus ir sunkiai išsiplauna. Kiuvečių paviršius turi būti švarus ir sausas. Galima liesti tik matinį (neskaidrū) kiuvečių paviršių. Būtina žinoti kiuvetės plotį (dažniausiai 1cm). Kvarcinės kiuvetės yra trapios ir brangios, todėl būkite atidūs.
2. Matuojant optinį tankį pirmiausia užrašoma nulinė sugertis, t. y. pamatuojama kontrolinės kiuvetės, kurioje yra tik tirpiklis, optimis tankis. Tai yra būtina, nes dalį šviesos sugeria kiuvetės medžiaga ir tirpiklis. Atmetus kontrolinės kiuvetės optinio tankio reikšmes (nusibrėžus nulinę liniją), galima pamatuoti tiriamo tirpalo tikslų optinį tankį.
3. Jeigu matuojant spektrofotometru tirpalo optinis tankis $A > 1$, tirpalą reikia praskiesti. Tačiau matuojant tirpaluoptinį tanką, kai spalva susidarė sureagavus sandams (pvz., nustatant baltymų, anglavandenį ir kitų medžiagų kiekius), negalima skiesti tokio spalvoto tirpalo, nes tuomet praskiedžiama tiek tiriamą medžiaga, tiek reagentai. Tokiu atveju reikia praskiesti pradinį medžiagos tirpalą ir atliliki reakciją.

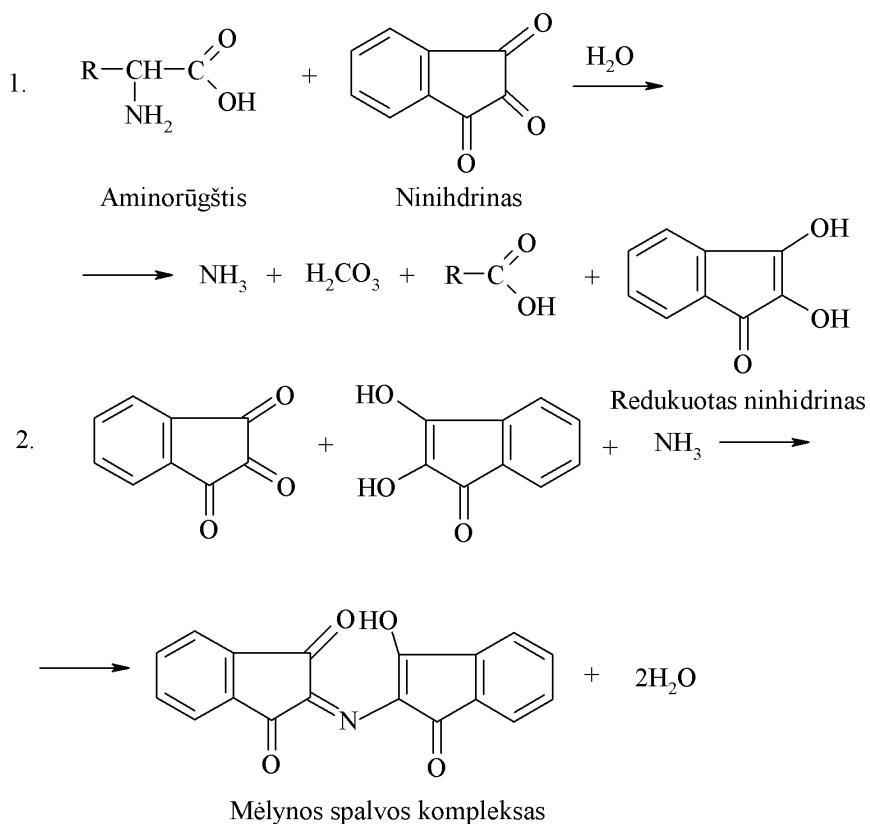
Literatūra

1. Wilson K., Walker J. (2003) Principles and techniques of practical biochemistry, 479–485.
2. Reed R., Holmes D., Weyers J., Jones A. (2003) Practical skills in biomolecular sciences

5.3. Kokybines aminorūgščių atpažinimo reakcijos.

5.3.1. Ninhidrino reakcija

Visos aminorūgštys, turinčios laisvą aminogrupę, reaguoja su ninkidrinu ir sudaro mėlynos spalvos kompleksus. Prolinas ir hidroksiprolinas su ninkidrinu sudaro geltonos spalvos kompleksus. Veikiant ninkidrinui, aminorūgštys oksiduoja ir suskyla iki amoniako, aldehydo ir angliarūgštės. Redukuotas ninkidrinas jungiasi su kita ninkidrino molekule ir amoniaku, susidaro sudėtingos struktūros spalvotas junginys. Analogiškai su ninkidrinu reaguoja laisvas aminogrupes turintys peptidai ir baltymai.



Reagentai

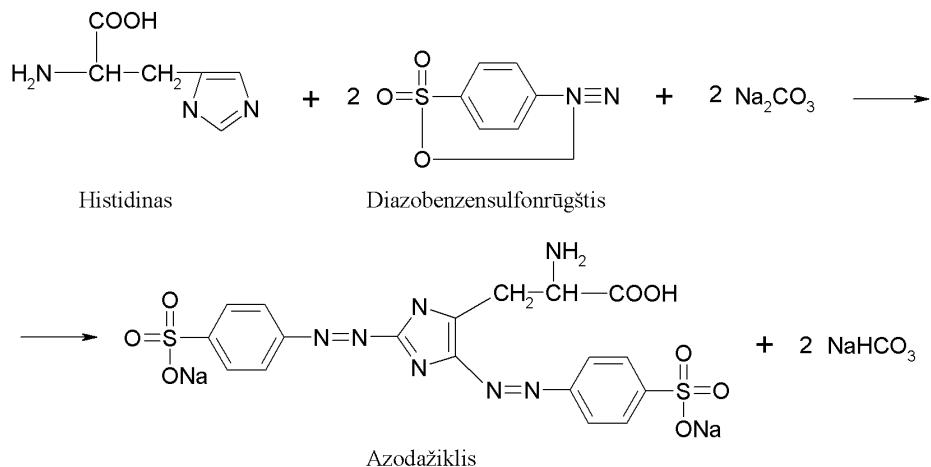
1. 0,1% aminorūgšties tirpalas.
 2. 1,0% balymo tirpalas.
 3. 0,1% ninhidrino tirpalas.

Darbo eiga

- Į vieną kūginį mègintuvèli pilama 0,2 ml 0,1% aminorùgšties, į kitą mègintuvèli – 0,2 ml 1% balymo tirpalo. Į trečiąjį (kontrolini) mègintuvèli vietoje aminorùgštis įlašinama 0,2 ml vandens.
- Į visus mègintuvèlius pilama po 0,1 ml 0,1% ninhidrino tirpalo ir užvirinama. Po 1–2 minučių tirpalai, kuriuose buvo aminorùgštys, nusidažo melsvai. Laikant spalva ryškėja.

5.3.2. Reakcija su histidinu ir tirozinu (Paulio reakcija)

Į šarminį histidino, tirozino arba balymo tirpalą pridėjus diazoreagento, tirpalas igauna oranžinę spalvą. Reakcijoje dalyvauja aminorùgštys – tirozinas ir histidinas, kurios, reaguodamos su diazobenzensulfonrùgštimi, sudaro oranžinės spalvos azodažiklį.



Azodažiklio spalvos ryškumas priklauso nuo histidino ir tirozino kieko. Iš visų į balymų sudėtį įeinančių aminorùgščių Pauli reakcija vyksta tik su histidinu ir tirozinu.

Reagentai

- 1,0% sulfanilo rùgšties tirpalas 2% druskos rùgštyje.
- 5,0% natrio nitrito tirpalas.
- 10,0% natrio karbonato tirpalas.
- 0,1% alanino tirpalas.
- 1,0% kiaušinio balymo tirpalas.

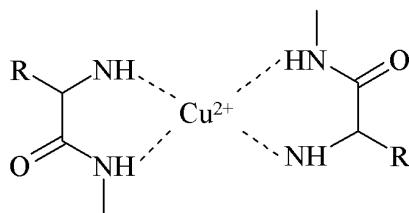
Darbo eiga

1. Į tris mègintuvélius įpilama po 0,1 ml 1,0% sulfanilo rùgšties tirpalo ir 0,1 ml 5,0% natrio nitrito tirpalo. Reakcijos mišinys suplakamas.
2. Į pirmajį mègintuvélį įpilama 0,2 ml 0,1% histidino, antrajį mègintuvélį – 0,2 ml 1% kiaušinio balytimo, trečiąjį mègintuvélį – 0,2 ml 0,1% alanino tirpalų.
3. Į visus mègintuvélius įpilama po 0,2 ml 10,0% natrio karbonato tirpalo.

Reakcijos mišinys pirmuose dviejuose mègintuvélioose nusidažo rausvai oranžine spalva.

5.3.3. Biureto reakcija peptidiniams ryšiams nustatyti

Labai šarminėje aplinkoje Cu^{2+} jonai, reaguodami su biuretu ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), oksamidu ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$), peptidais ar balytmais, sudaro mèlynai violetinius ar raudonai violetinius kompleksus. Biureto reakciją lemia peptidinių ryšių buvimas. Kad susidarytų spalvotas kompleksas reikalingi mažiausiai du peptidiniai ryšiai. Manomo Cu^{2+} ir peptido komplekso struktūra parodyta 5.4 pav.



5.4 pav. Manomas Cu^{2+} ir peptidinio ryšio kompleksas

Biureto komplekso spalva priklauso nuo vario druskos kiekio tirpale ir nuo medžiagos struktūros. Balytymu irimo produktai peptonai sudaro rausvos spalvos kompleksus.

Magnio sulfatas ir amonio sulfatas tirpale trukdo biureto reakcijai. Esant amonio druskoms, reikia imti didelį šarmo perteklių.

Reagentai

1. 1,0% kviečių balytmas.
2. 1,0% kiaušinio balytmas.
3. 0,1% aminorùgščių tirpalas.
4. 10,0% natrio hidroksidas.
5. 0,1% vario sulfatas.

Darbo eiga

1. Į vieną mēgintuvėlį įpilama 0,2ml 1,0% kviečių baltymo, į antrajį mēgintuvėlį – 0,2 ml 1% kiaušinio baltymo, į trečiąjį mēgintuvėlį – 0,2ml 0,1% aminorūgšties tirpalą.
2. Į visus mēgintuvėlius įpilama po 0,2 ml 10,0% natrio hidroksido bei 1 – 2 lašus 0,1% vario sulfato tirpalą ir sumaišoma.

Reakcijos mišinys pirmuojuose dvejuose mēgintuvėliuose nusidažo violetine spalva.

Kontroliniai klausimai

1. Kurios aminorūgštys dalyvauja Pauli reakcijoje? Užrašykite jų struktūrą.
2. Kodėl alaninas su vario jonais šarminėje aplinkoje nesudaro spalvoto junginio?
3. Kurio metalo jonai dalyvauja susidarančių kompleksinių junginių biureto reakcijoje?
4. Kurios baltymų ir aminorūgščių funkcinės grupės reaguoja su ninhidrinu?
5. Ar reaguoja su ninhidrinu jūsų odos baltymai?

5.4. Kokybinės angliavandeniu nustatymo reakcijos

5.4.1. Selivanovo reakcija ketoheksozems nustatyti

Selivanovo reakcija atliekama ketozems pažinti. Fruktozę veikiant druskos rūgštimi, susidaro oksimetilfurfuolas, kuris su rezorcinoliu sudaro raudonos spalvos kondensacijos produktą. Šia reakcija galima atskirti gliukozę nuo fruktozės. Selivanovo reakcija vyksta su disacharidais (pvz., sacharoze), į kurių sudėtį įeina fruktozė. Rūgstinės hidrolizės metu išsiskiria fruktozė, kuri ir nusidažo. Gliukozės tirpalas nusidažo silpna rausva spalva tik po ilgo virinimo su rezorcinoliu.

Reagentai

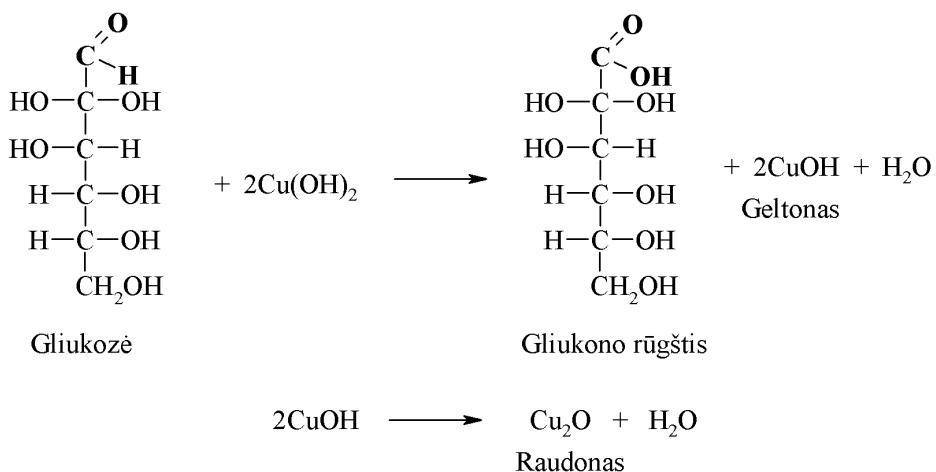
1. Tolenso reagentas (1,0% rezorcinolio tirpalas koncentruotoje druskos rūgštyste).
2. 1,0% sacharozės tirpalas.
3. 1,0% gliukozės tirpalas.
4. 1,0% fruktozės tirpalas.

Darbo eiga

1. Į tris kūginius mēgintuvėlius įpilama po $300\mu\text{l}$ sacharozės, fruktozės ir gliukozės tirpalų atitinkamai.
2. Į visus mēgintuvėlius įpilama po $100\mu\text{l}$ Toleno reagento.
3. Lėtai šildant, tirpalas, kuriame ištirpinta fruktozė ir sacharozė, nusidažo raudona spalva. Reakcijos mišinys, kuriame yra gliukozė, spalvoto junginio su Toleno reagentu nesudaro.

5.4.2. Triomerio reakcija aldozėms nustatyti

Aldozės šarminėje terpeje redukuoja dvivalenčio vario hidroksidą iki vienvalenčio. Susidaręs vienvalenčio vario hidroksidas ir jo skilimo produktas vario oksidas yra spalvoti junginiai. Reakcijos metu vyksta gliukozės oksidacija ir dvivalenčio vario hidroksido redukcija.



Reagentai

- 1,0% sacharozės tirpalas.
- 1,0% gliukozės tirpalas.
- 10,0% natrio hidroksidas.
- 2,0% vario sulfatas.

Darbo eiga

- I mègintuvèlij ipilama 0,5 ml gliukozės tirpalo ir 0,15 ml 10,0% natrio hidroksido tirpalo.
- Vèliau atsargiai lašinamas 2,0% vario sulfato tirpalas (20–40 μ l) tol, kol susidaręs melsvas drumstumas, purtant mègintuvèlij, neišnyksta.
- Tirpalas pašildomas. Esant gliukozei, iš pradžių susidariusios geltonos vienvalenčio vario hidroksido nuosèdos virsta raudonomis vienvalenčio vario oksido nuosèdomis.
- Analogiškai, kaip ir 1 – 3 punktuose, atliekama reakcija su sacharozės tirpalu.

5.5. Baltymų kieko nustatymas

Baltymų kiekiui tirpale nustatyti plačiausiai taikomi kolorimetrijos metodai. Baltymo tirpalą veikiant atitinkamu reagentu susidaro spalvotas junginys, kurio šviesos sugertis nustatoma spektrofotometrijos būdu. Baltymo kiekis proporcingas spalvos ryškumui ir nustatomas iš kalibravimo kreivės. Kalibravimo kreivės dažniausiai paruošiamos su jaučio serumo albuminu. Tačiau spalvos ryšumas priklauso nuo baltymo aminorūgščių sudėties, prostetinių grupių buvimo. Baltymų koncentracijai tiriamajame mėginyje nustatyti taikomi keli metodai: šviesos sugerties matavimas ultravioletinėje spektro dalyje, Bredfordo, Louri, bisinchoninės rūgštis, biureto metodai.

5.5.1. Baltymų koncentracijos nustatymas, matuojant ultravioletinės šviesos sugertį ties 280 nm.

Aromatinių aminorūgščių triptofano ir tirozino liekanos baltymuose sugeria šviesą ties 280 nm. Metodas gana jautrus. Galima pamatuoti $10\mu\text{g}/\text{ml}$ – $1\text{mg}/\text{ml}$ baltymų koncentracijas. Patogu, kad pamatavas sugerti, baltymų tirpalus galima toliau naudoti. Metodas plačiai taikomas baltymų, praėjusių pro chromatografines kolonėles, koncentracijoms nustatyti. Tam tikrų baltymų sugerties koeficientai skiriasi, tačiau, apytikriai, baltymų tirpalo, kurio sugertis $A_{280}=1$, koncentracija yra lygi $1\text{mg}/\text{ml}$, jeigu kiuvetės plotis lygus 1 cm.

Baltymų tirpaluose būna ir kitų medžiagų (pvz. nukleorūgščių), kurios sugeria šviesą ties 280 nm ir trukdo tiksliai nustatyti baltymų kiekį tirpale. Matuojant baltyminių tirpalų sugertį ties 260 nm ir 280 nm, galima patikslinti baltymų koncentraciją. Nustatyta, kad:

$$\text{Baltymas (mg/ml)} = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$$

Peptidiniai baltymų ryšiai sugeria šviesą ties 190 nm. Praktiškai baltymų sugertis (pvz., frakcionavimo metu) matuojama ties 210 nm. Jei baltymo koncentracija lygi $1\mu\text{g}/\text{ml}$, tirpalo sugertis $A_{210}=20$. Šis metodas taikomas retai, nes matuojant sugertį ties 210 nm labai didelę įtaką turi šalutinių medžiagų sugertis.

Norint tiksliai nustatyti baltymo koncentraciją dažniausiai taikomi Bredfordo ir Louri pasiūlyti metodai.

5.5.2. Baltymo kieko nustatymas Bredfordo metodu.

Baltymai jungiasi su Kumasi briliantinio mėlio dažikliu ir matuojamas susidariusio komplekso spalvos intensyvumas. Gryno dažiklio katijoninė forma sugeria šviesą ties 470 nm ir 650 nm, o susijungusi su baltymo arginino ir aromatinėmis aminorūgtimis anijoninė dažiklio forma sugeria šviesą ties 595 nm. Šis metodas yra paprastas, greitesnis

negu Louri. Spalvotas junginys susidaro greitai ir yra stabilus. Galima nustatyti 1 – 10 µg/ml balytmų koncentracijas. Tačiau susidariusio komplekso spalvos ryšumas priklauso nuo balytumo sudėties. Glicerolis, detergentai, α -merkaptoetanolis, acto rūgštis, amonio sulfatas, TRIS ir tam tikri šarminiai buferiai taip pat turi įtakos spalvotam kompleksiniui junginiui susidaryti. Dažiklis gana tvirtai prilimpa prie kvarcinių kiuvečių paviršiaus ir sunkiai nusiplauna.

Reagentai

1. 0,5 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas – 2 ml. Laikyt – 20°C temperatūros sąlygomis.
2. 0,15M NaCl tirpalas, 50 ml.
3. Kumasi briliantinio mėlio G250 dažiklio tirpalas: 50 mg Kumasi briliantinio mėlio G250 ištirpinama 25 ml 95% etanolio ir į pilama 50 ml 85% fosforo rūgštis. Į pilama vandens iki 0,5 litro. Filtruojama. Laikoma 4°C temperatūros sąlygomis.

Darbo eiga

Visiems kalibravimo kreivės taškams nustatyti procedūra atliekama po 2 kartus.

1. Į 8 mēgintuvėlius į pilama atitinkamai po 10, 20, 30, ir 40 µl jaučio serumo albumino tirpalo ir į visus į pilama iki 100 µl 0,15 M NaCl tirpalo. Į kontrolinius (9,10) mēgintuvėlius į pilama tik po 100 µl 0,15 M NaCl tirpalo.
2. Į visus mēgintuvėlius į pilama po 1,0 ml Kumasi briliantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma.
3. Laikoma 2 min. kambario temperatūros sąlygomis.
4. Spektrofotometru pamatuojama sugertis ties $\lambda = 595$ nm (A_{595}) ir braižoma kalibravimo kreivė. Ant ordinačių ašies pažymima sugertis (A_{595}), o ant abscisių – balytumo kiekis (µg).
5. Į 50 µl nežinomos koncentracijos balytumo tirpalą į pilama iki 100 µl 0,15 M NaCl tirpalo, 1,0 ml Kumasi briliantinio mėlio G 250 tirpalo ir sumaišoma. Laikoma 2 min. kambario temperatūros sąlygomis. Spektrofotometru pamatuojama A_{595} , balytumo kiekis nustatomas iš kalibravimo kreivės. Jeigu matuojamojo balytumo sugertis yra didelė ir nustatyti duomenys nepatenka į kalibravimo kreivės ribas, tada **nežinomos koncentracijos balytmas prasiskiedžiamas** ir matavimas kartojamas. Susidarius spalvotam junginiui tirpalo skiesti negalima.

5.5.3. Baltymo kieko nustatymas Louri metodu

Tai jautrus, anksčiau plačiai taikytas metodas, kuriuo galima nustatyti 1 – 20 µg/ml baltymų koncentracijas. Reagujant Folino ir Čiokateu reagentui (mišinys natrio tartrato, molibdato ir fosfato kartu su vario sulfato tirpalu) su peptidiniais baltymų ryšiais ir tirozino aminorūgščių liekanomis, susidaro spalvoti kompleksiniai junginiai, kurių sugertis matuojama ties 750 nm. Jautumas skirtiniams baltymams beveik nesiskiria. Tačiau yra daug medžiagų, kurios turi įtakos spalvotam kompleksiniams junginiui susidaryti. Tokios medžiagos yra detergentai, denatūruojantys veiksniai, tam tikri buferiai (TRIS, Pipes, Hepes) ir sieros turintys junginiai. Baltymo nusodinimas deoksicholatu/trichloracto rūgštimi, padeda išvengti dalies medžiagų neigiamos įtakos. Susidaręs spalvotas kompleksinis junginys yra stabilus (A_{750} mažėja 1–2% laikant 1 valandą kambario temperatūros sąlygomis).

Reagentai

1. 0,5 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas – 2ml. Laikyti – 20°C temperatūros sąlygomis.
2. 0,8 M NaOH.
3. 10,0% natrio dodecilsulfato tirpalas.
4. Vario tartrato/karbonato (CTC) tirpalas.
 - a) *CTC pradinis tirpalas*: į 50 ml 0,2% $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,2% kalio tartrato tirpalą lėtai įpilama, stipriai maišant, 50 ml 20% natrio karbonato tirpalu. CTC pradinis tirpalas yra tinkamas naudoti 8 savaites, laikant kambario temperatūros sąlygomis.
 - b) *CTC darbinis tirpalas*: vienodais tūriais sumaišomas CTC pradinis tirpalas, 0,8 M NaOH, 10% natrio dodecilsulfato tirpalas ir vanduo. Šis reagentas yra stabilus kambario temperatūros sąlygomis 1 – 2 savaites.
5. Folino ir Čiokateu reagentas. Reagento paruošimas: apvaliadugnėje kolboje 700ml vandens ištirpinama 100 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ir 25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Pilama 50ml 85% fosfato rūgštis ir 100 ml koncentruotos druskos rūgštis. Prijungiamas Lybigo kondensatorius ir mišinys 10 valandų virinamas. Dedama 150 g ličio sulfato, 50 ml vandens ir keli bromo lašai. Nuėmus Libicho šaldytuvą, 15 min. virinama traukos spintoje. Tokiu būdu pašalinamas bromo perteklius. Tirpalas atuašinamas ir pripilama vandens iki 1 litro. Filtruojama pro stiklo filtrą. Visų šio reagento ruošimo stadijų metu tirpalu spalva turi būti geltona. Jei mišinys turi žalsvą atspalvį, vadinas, šis reagentas buvo ruošiamas iš nešvarių medžiagų. Dažniausiai tai įvyksta dėl tam tikrų katijonų priemaišų druskos rūgštyje. Paruoštas Folino ir Čiokateu reagentas titruojamas 1 M šarmo tirpalu ir nustatoma jo koncentracija. Folino ir Čiokateu reagentas laikomas tamsaus stiklo butelyje.

Darbo eiga

Visiems kalibravimo kreivės taškams nustatyti procedūra atliekama po 2 kartus.

1. Į 8 mègintuvėlius įpilama atitinkamai 10, 20, 30, ir 40 µl jaučio serumo albumino tirpalo ir į kiekvieną vandens iki 200 µl. Į kontrolinius (9, 10 mègintuvėlius) pilama tik 200 µl vandens.
2. Į visus mègintuvėlius įpilama po 200 µl CTC darbinio tirpalio ir sumaišoma.
3. Mègintuvėliai laikomi 10 min. kambario temperatūros sąlygomis.
4. Pilama 100 µl 0,4 N Folino ir Čiokateu reagento ir nedelsiant sumaišoma.
Mègintuvėliai laikomi 30 min. kambario temperatūros sąlygomis.
5. Fotoelektrokolorimetru pamatuojama sugertis ties 750 nm (A_{750}) ir bražoma kalibravimo kreivė. Ant ordinačių ašies pažymima sugertis (A_{750}), o ant abscisių – balytmo kiekis (µg).
6. Į du mègintuvėlius, turinčius po 50 µl nežinomas koncentracijos balytmo tirpalą, pilama vandens iki 200 µl, 200 µl CTC darbinio tirpalio ir sumaišoma. Laikoma 10 min. kambario temperatūros sąlygomis. Įpilama 100 µl 0,4 N Folino ir Čiokateu reagento, nedelsiant sumaišoma. Laikoma 30 min. kambario temperatūros sąlygomis. Fotoelektrokolorimetru pamatuojama A_{750} . Balytmo kiekis nustatomas iš kalibravimo kreivės. Jeigu matuojamamojo balytmo sugertis yra didelė ir nustatyti duomenys nepatenka į kalibravimo kreivės ribas, tada **nežinomas koncentracijos balytmas praskiedžiamas** ir matavimas kartojamas. Susidarius spalvotam tirpalui negalima skiesti tirpalio.

5.5.4. Balytmo kieko nustatymas bisinchoninės rūgšties (BCA) metodu

Šis metodas panašus į Louri metodą, tačiau jautresnis. Juo galima nustatyti 0,5 µg/ml balytymų koncentracijas. Bisinchoninės rūgšties natrio druska gerai tirpsta vandenye, yra stabili, šarminėje aplinkoje sudaro su Cu^{1+} jonais kompleksinį, ryškiai raudonos spalvos junginį. Idėjus balytmo tirpalio susidaro naujas kompleksinis junginys su Cu^{2+} ionais, kurio spalvos ryškumas yra susijęs su balytmo koncentracija tirpale. Tirpalio šviesos sugertis matuojama ties 562 nm. BCA metodas mažiau jautresnis įvairiomis priemaišoms negu Louri metodas.

Reagentai

1. 0,5 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas – 2 ml. Laikomas – 20°C temperatūros sąlygomis.
2. *Reagentas A* – 200 ml (stabilus kambario temperatūros sąlygomis ilgą laiką). Tirpalo sudėtis: 1% BCANa₂, 2% Na₂CO₃, 0,16% Na₂tartratas, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃. Ištirpinus reagentus apytikriaai 150 ml vandens, koncentruotu NaOH tirpalu pasiekiamas pH 11,25 (BCA optimumas), vėliau dejonizuotu

H_2O tirpalas praskiedžiamas iki 200 ml.

3. Reagentas B – 5 ml (stabilus kambario temperatūros sąlygomis ilgą laiką).
- 4% $CuSO_4 \times 5H_2O$.
4. Standartinis darbinis reagentas (S-DR)

$$S\text{-}DR = 100 \text{ tūrių A} + 2 \text{ tūriai B.}$$
 Ruošiamas kas savaitę. Spalva žalsva.

Darbo eiga

Visiems kalibravimo kreivės taškams nustatyti procedūra atliekama po 2 kartus.

1. Į 8 mēgintuvėlius pilama atitinkamai 10, 20, 30, ir 40 μl jaučio serumo albumino tirpalo ir į kiekvieną vandens iki 50 μl . Į kontrolinius mēgintuvėlius (9,10) priplama tik 50 μl dejonizuoto vandens.
2. Į visus mēgintuvėlius įpilama 950 μl S-DR tirpalo ir sumaišoma.
3. Laikoma 30 min., 37°C temperatūros sąlygomis.
4. Atvésinama iki kambario temperatūros, palaikant mēgintuvėlius 5 min. kambario temperatūros sąlygomis.
5. Tirpalų sugertis matuojama spektrofotometru ties $\lambda=562$ nm, iš gautų duomenų bražoma kalibravimo kreivė. Ant ordinačių ašies atidedama sugertis (A_{562}), o ant abscisių – balytmo kiekis (μg).
6. Į mēgintuvėli įpilama 50 μl tiriamo balytmo tirpalo ir 950 μl S-DR tirpalo. Sumaišius turi atsirasti rausva spalva. Laikoma 30min, 37°C temperatūroje. Atvésinama iki kambario temperatūros, palaikant mēgintuvėlius 10 min. kambario temperatūroje. Tirpalų sugertis matuojama spektrofotometru ties $\lambda=562$ nm. Tiriamo balytmo kiekis nustatomas iš kalibravimo kreivės. Jeigu matuojamoj balytmo sugertis yra didelė ir gautas rezultatas nepatenka į kalibracinių kreivės ribas, tada **nežinomas koncentracijos balytmas praskiedžiamas** ir matavimas pakartojamas. Negalima skiesti tirpalo, kai jau susidarė spalvotas junginys.

5.5.5. Balytų kiekių nustatymas biureto metodu

Reagujant vario jonams su peptidiniu ryšiu, susidaro violetinės spalvos kompleksinis junginys. Ši spalvinė reakcija taikoma balytų kiekiui nustatyti. Reakcija su biureto reagentu yra mažiau jautri, negu su Folino reagentu arba BCA. Tačiau, ją atliekant, galima nustatyti didesnius balytų kiekius. Amonio jonai, TRIS, sacharozė, glicerolis trukdo reakcijai, nes keičia kompleksinio junginio spalvą. Lipidai ir detergentai gali sudrumsti tirpalus.

Reagentai

1. 0,5mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas – 2 ml. Laikyti –20°C temperatūros sąlygomis.

2. Biureto reagentas – 250 ml. 2,25 g NaK tartrato, 0,75 g CuSO₄×5H₂O, 1,25 g KJ paeiliui ištirpinami 100 ml 0,2 M NaOH. Įpilama vandens iki 250 ml. Jeigu susidaro juodos nuosėdos, nufiltruojama.

Reagentas laikomas polietileniniame inde.

Darbo eiga

Visiems kalibravimo kreivės taškams nustatyti procedūra atliekama po 2 kartus.

1. Į 8 mēgintuvėlius įpilama 20, 50, 100 ir 200 µl jaučio serumo albumino tirpalo ir į kiekvieną įpilama vandens iki 200 µl. Į kontrolinius (9, 10 mēgintuvėlius) įpilama tik 200 µl vandens.
2. Į visus mēgintuvėlius įpilama po 800 līl biureto reagento ir sumaišoma.
3. Tirpalai laikomi kambario temperatūros sąlygomis 15 min.
4. Tirpalų sugertis matuojama spektrofotometru ties $\lambda = 650$ nm, iš gautų duomenų braižoma kalibravimo kreivė. Ant ordinačių ašies pažymima sugertis (A_{540}), o ant abscisių – baltymo kiekis (µg).
5. Į mēgintuvėli įpilama 50 līl tiriamo baltymo tirpalo, 150 µl vandens ir 800 µl Biureto reagento. Mēginys laikomas kambario temperatūros sąlygomis 15 min. ir sugertis matuojama spektrofotometru ties $\lambda = 540$ nm arba kalorimetru ties 540–650 nm. Tiriamo baltymo kiekis nustatomas iš kalibravimo kreivės. Jeigu matuojamą baltymo tirpalo sugertis yra didelė ir nustatyti duomenys nepatenka į kalibravimo kreivės ribas, tada **nežinomos koncentracijos baltymo tirpalas** yra praskiedžiamas ir matavimas kartojamas. Susidarius spalvotam junginiui, negalima skiesti tirpalo.

Literatūra

1. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., V.193, p.265–275.
2. Cadman E., Bostwick J.R., Eichberg J. (1979). Determination of protein by a modified Lowry procedure in the presence of some commonly used detergents. Anal. Biochem., V.96, p.21–23.
3. Peterson G.L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem., V.100, p.201–220.
4. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., V. p.248–254
5. Smith P.K et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry V.150, p.76–85.
6. Wilson K., Walker J. (2003) Principles and techniques of practical biochemistry, 479–485.

Kontroliniai klausimai:

1. Kurios medžiagos trukdo baltymo kiekį nustatyti Bredfordo metodu?
2. Kaip spektrines medžiagų savybes lemia terpės rūgštingumas?
3. Tirpalo koncentracijos priklausomumas nuo šviesos sugerties. Bero ir Lambertu dėsnis.
4. Kurios aminorūgštys sugeria šviesą ties 280 nm ?
5. Kurios medžiagos dažnai trukdo matuoti baltymų sugertį ultravioletinėje srityje?
6. Kokio bangos ilgio šviesą sugeria peptidiniai ryšiai ?

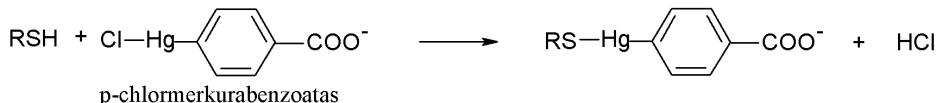
6. Baltymų ir peptidų merkaptogrupių nustatymas

Biologinis baltymų aktyvumas ir makromolekulinė jų struktūra pasikeičia, oksiduojant arba blokuojant baltymų merkaptogrupes ($-SH$). Šios grupės gali ieiti į aktyvų fermento centrą ir dalyvauti katalizėje. Jos sudaro disulfidinius ryšius ir palaiko baltymo tretinę struktūrą. Daugelio fermentų aktyvumas yra slopinamas oksiduojant SH grupes ar blokuojant jas tam tikrais veiksniais. Merkaptogrupės ištraukiamos į tam tikras chemines reakcijas (acilinimo, oksidacijos, alkilinimo, toliatų susidarymo). Be to SH grupės sudaro vandenilinius ryšius.

Merkaptogrupėms nustatyti taikomi šie metodai: 1) amperometrinis titravimas, naudojant sidabro nitratą; 2) spektrofotometrinis titravimas su p-chlormerkurabenzoatu (pCMB) arba 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzenkarboksirūgštimi) – Elmano reagentu.

6.1. Merkaptogrupių nustatymas baltymuose arba peptiduose titruojant su p-chlormerkurabenzoatu

p-chlormerkurabenzoatas su laisvomis baltymų ar peptidų SH grupėmis sudaro toliato kompleksą, kurio šviesos sugerties maksimumas yra ties 250 nm. Matujant šviesos sugertį ties 250 nm galima nustatyti SH grupių kiekį tenkanti 1 moliui baltymo.



6.1.1. p-chlormerkurabenzoato tirpalo paruošimas ir jo koncentracijos nustatymas spektrofotometrijos būdu

Norint nustatyti baltymų SH grupių skaičių, reikia žinoti tikslią p-chlormerkurabenzoato tirpalo koncentraciją. p-chlormerkurabenzoato šviesos sugerties maksimumas yra ties 232 nm. pCMB molinės ekstinkcijos koeficientas $\epsilon_M = 1,69 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Pamatavus p-chlormerkurabenzoato tirpalo šviesos sugertį ties 232 nm, atsižvelgiant į Bero ir Lamberto dėsnį, galima apskaičiuoti p-chlormerkurabenzoato tirpalo koncentraciją.

Reagentai:

1. $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ p-chlormerkurabenzoato tirpalas, 10 ml.
2. 0,5 M KCl tirpalas (pH 7,6), 25 ml.
3. 2,0 M KOH tirpalas, 5ml.
4. 0,5 M HCl tirpalas, 5ml.

Darbo eiga:

1. Pasvertas p-chlormerkurabzenzoatas suberiamas į 10 ml kolbutę, pilama 5 ml distiliuoto vandens, pašarminto 2 M KOH iki pH 11 (matuojama su indikatoriniu popierėliu).
2. I p-chlormerkurabzenzoato tirpalą maišant pamažu lašinamas 0,5 M HCl tirpalas, kol pasiekima pH reikšmė lygi 7,6 (matuojama pH metru). Ilašinus per daug rūgšties iškrenta pCMB nuosėdos ir tirpalas susidrumsčia. Paruošus skaidrų pH 7,6 tirpalą, pilamas distiliuotas vanduo iki 10 ml.
3. I dvi spektrofotometro kiuvetes pilama po 2,8 ml KCl tirpalo.
4. I vieną kiuvetę (antroji yra kontrolinė) pilama 0,05 ml p-chlormerkurabzenzoato tirpalo ir kruopščiai sumaišoma.
5. Pamatuojama tirpalo šviesos sugertis ties 232 nm.
6. I kiuvetę dar tris kartus į pilama po 0,05 ml p-chlormerkurabzenzoato tirpalo, kruopščiai sumaišoma ir kiekvieną kartą pamatuojama tirpalo šviesos sugertis ties 232 nm.
7. pCMB tirpalo koncentraciją apskaičiuojama po kiekvieno p-chlormerkurabzenzoato tirpalo pridėjimo:

$$C_{\text{pCMB}} = \frac{A_{232} \times (2,8 + V)}{1,69 \times 10^4 \times V},$$

čia A_{232} – šviesos sugertis, V – pridėto pCMB tirpalo tūris.

6.1.2. Glutationo merkaptogrupių nustatymas

Reagentai:

1. 1×10^{-3} M redukuoto glutationo tirpalas, 2 ml.
2. 5×10^{-4} M p-chlormerkurabzenzoato tirpalas, 1 ml.
3. 0,5 M KCl tirpalas (pH 7,6), 25 ml.

Darbo eiga:

1. I spektrofotometro kiuvetę pilama 0,1 ml 1×10^{-3} M redukuoto glutationo tirpalo ir 2,7 ml 0,5M KCl tirpalo.
2. I kontrolinę kiuvetę į pilama 2,8 ml 0,5 M KCl tirpalo.
3. I abi kiuvetes į pilama po 0,04 ml p-chlormerkurabzenzoato tirpalo ir kruopščiai sumaišoma.
4. Po 2 min. matuojama šviesos sugertis ties 250 nm.
5. Tris kartus i abi kiuvetes pilama po 0,04 ml p-chlormerkurabzenzoato tirpalo, kruopščiai sumaišoma.

6. Po 2 min. matuojama šviesos sugertis ties 250 nm.
7. p-chlormerkurabenoato tirpalo priedų tūris sumažinamas iki 0,02 ml, o po dviejų kartų iki 0,01 ml.
8. Po 2 min. matuojama šviesos sugertis ties 250 nm.
Matavimai baigiami, kai po naujos p-chlormerkurabenoato tirpalo porcijos pridėjimo tirpalo šviesos sugertis nebesikeičia.
9. Nubrėžiamas šviesos sugerties A_{250} priklausomumo nuo pridėto p-chlormerkurabenoato tirpalo tūrio grafikas. Nustatomas p-chlormerkurabenoato tirpalo tūris, atitinkantis kreivės lūžio tašką.

Ekvivalentiniame taške yra susijungusios visos SH grupės. Atnižvelgiant į sunaudoto p-chlormerkurabenoato kiekį galima apskaičiuoti SH grupių kiekį, esantį 1 mol redukuoto glutationo:

$$n = \frac{C_2 \times V_2}{C_1 \times V_1},$$

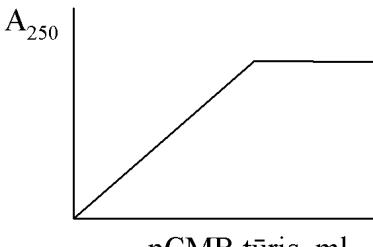
n – merkaptogrupių kiekis, esantis 1 mol glutationo.

C_1 – tiriamos medžiagos (glutationo) pradinė koncentracija.

V_1 – tiriamo tirpalo tūris.

C_2 – pradinė pCMB koncentracija.

V_2 – pridėto pCMB tirpalo tūris ekvivalentiniame taške.



6.1 pav. Merkaptogrupių titravimo kreivė

6.1.3. Merkaptogrupių nustatymas balytymuose

Reagentai:

1. 1 mg albumino, ištirpinto 1 ml 0,5 M KCl, 10ml.
2. 5×10^{-4} p-chlormerkuribenoato tirpalas, 1ml.
3. 0,5 M KCl tirpalas (pH 7,6), 25 ml.

Darbo eiga:

1. Į vieną spektrofotometro kiuvetę įpilama 2,8 ml balytymo tirpalo, o į kitą, kontrolinę – 2,8 ml 0,5M KCl tirpalo.
2. Po to į abi kiuvetes įpilama po 0,04 ml 5×10^{-4} p-chlormerkurabenoato tirpalo, gerai išmaišoma.
3. Po 2 min. pamatuojama šviesos sugertis ties 250 nm.
4. Analogiškai glutationui nustatomas SH grupių kiekis albumine. Nubrėžiama SH grupių titravimo kreivė, nustatomas ekvivalentinis taškas, apskaičiuojamas merkaptogrupių kiekis, tenkantis vienam moliui balytymo.

6.1.4. Šlapalo poveikis SH grupių kiekiui balytumo molekulėje.**Darbo eiga**

1. Į tris mègintuvèlius jipilama po 1,5 ml balytumo tirpalo ir 1,5 ml 2M, 4M, 6M šlapalo tirpalų atitinkamai.
2. Inkubuojama 5 min. kambario temperatūros sàlygomis.
3. Po inkubacijos nustatomas merkaptogrupių kiekis visuose trijuose mègintuvèliuose.
4. Nubraižomas grafikas, atspindintis SH grupių kieko priklausumą nuo šlapalo koncentracijos.

7. Chromatografija

Chromatografija – junginių išskyrimo iš mišinių, jų gryninimo ir analizės metodas.

Chromatografijos pradininkas yra rusų botanikas Michailas Cvetas. Tai pirmasis mokslininkas, kuris 1903 m. sėkmingai išskyrė kelis augalų pigmentus, mišinį praleisdamas pro kalcio karbonato kolonėlę. Jis įrodė, kad chlorofilas nėra vienintelis augalų pigmentas. Šiuo metu chromatografijos technika yra labai tobula. Naudojamos automatizuotos sistemos, padedančios išgryninti ne tik tam tikros struktūros cheminius junginius, atskirti enantiomerus (stereoizomerus izomerus), bet analizuoti biologiškai aktyvias, labilias medžiagas – fermentus, nukleorūgštis

Chromatografija gali būti **analizinė**, taikoma junginiams nustatyti, struktūrai analizuoti, arba **preparatyvinė** – išskiriant ir gryninant didelius medžiagų kiekius

7.1. Chromatografijos pasiskirstymo koeficientas

Bendru atveju visos chromatografinės sistemos susideda iš dviejų sandū – **nuostoviosios** (stacionariosios) **fazės**, kuri gali būti kieta, skysta arba gelis, ir iš **judriosios fazės**, kuri būna skysta (**skysčių chromatografija**) arba dujinė (**dujų chromatografija**). Judrioji fazė teka (juda) pro nuostovią fazę. Chromatografijos specialistai vartoja tokius terminus: nuostovioji fazė dažnai vadinama **sorbentu** arba **nešikliu**, o judrioji fazė – **eliuentu** (tirpiklis arba buferis). Eliuentas, turintis ištirpusią išskiriamą medžiagą, vadinamas **eliuatu**. Nuostovioji ir judrioji fazės yra parenkamos tokios, kad išskiriamos iš mišinio medžiagos tarp fazų pasiskirstytų skirtingai, t. y. turėtų skirtingą **pasiskirstymo koeficientą** R_f . Pasiskirstymo koeficientas apibrėžia, kaip medžiagos kiekis (koncentracija) pasiskirsto tarp dviejų nesimaišančių fazų A ir B. Išskiriamos medžiagos pasiskirstymo koeficientas yra nekintamas dydis, esant toms pačioms fazėms A ir B, pastoviai temperatūrai ir kitoms chromatografavimo sąlygomis. Pasiskirstymo koeficientas išreiškiamas lygtimi:

$$\frac{\text{judriosios fazės A medžiagos koncentracija}}{\text{nuostoviosios fazės B medžiagos koncentracija}} = R_f$$

Chromatografija veiksminga, jei visas išskiriamos iš mišinio medžiagos kiekis yra vienoje iš fazų (A arba B). Tai pasiekiamas parenkant chromatografijos būdą pagal nuostoviosios ir judriosios fazės sąveikos mechanizmą:

- **adsorbcinė chromatografija** – hidrofobinės sąveikos chromatografija – adsorbcijos pusiausvyra tarp nuostoviosios kietos ir judriosios skystos fazės;

- **pasiskirstymo chromatografija** – chromatografijos būdas, kai nuostovioji ir judrioji fazės yra nesimaišantys arba iš dalies susimaišantys skysčiai, o chromatografuojama medžiaga pasiskirsto tarp fazių pagal giminingumą (tirpumą);
- **jonų mainų chromatografija**, chromatofokusavimas – jonų pusiausvyra tarp joninio nešiklio ir judriosios fazės buferio ar elektrolito;
- **giminingumo** (afininė), imunoafininė, metalo–chelato–afininė chromatografija – pusiausvyra tarp nuostoviosios fazės imobilizuoto (išverto ligando ir skystos judriosios fazės;
- **molekulių išskyrimo chromatografija, gelchromatografija** – kai molekulės atskiriamos pagal dydį ar formą sieto principu, leidžiant tekėti pro porėtus nešiklius.

7.2. Chromatografijos būdai

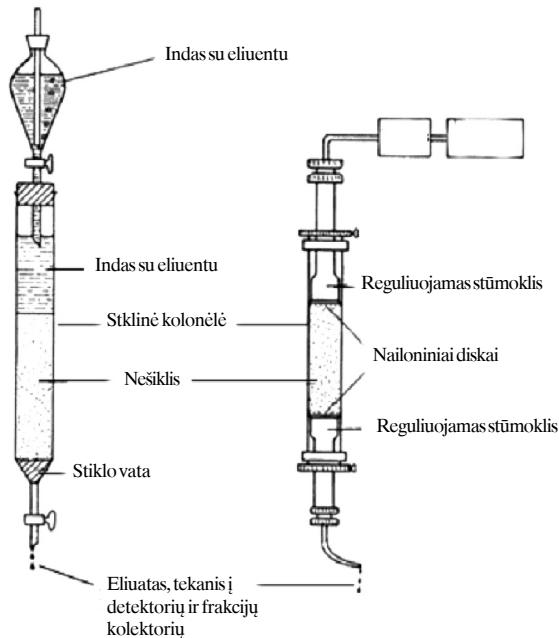
Medžiagoms atskirti taikomi du pagrindiniai chromatografijos būdai:

- **kolonelinė chromatografija** – nuostovioji fazė (sorbentas/nešiklis) yra dedama į stiklo, plastiko ar metalinę kolonėlę, o judrioji fazė teka pro kolonėlę dėl skysčio lygio skirtumo arba stumiamą siurbliuku. Tai dažniausiai naudojamas chromatografijos būdas.
- **plokščioji** (plonasluoksnė, popieriaus) **chromatografija** – nuostovioji fazė – tai plonu nešiklio sluoksniu padengta stiklo, plastiko ar metalo folijos plokšteliė arba chromatografinio popieriaus celiuliozės pluoštas. Judrioji fazė (tirpiklių sistema) kapiliarinio veikimo principu teka pro ploną nešiklio sluoksnį ar chromatografinį popierių. Naudojant šį chromatografijos būdą, vienu metu galima analizuoti daug mėginių. Plonasluoksnės chromatografijos procesas yra greitas. Jam reikia mažo tiriamos medžiagos kiekio, todėl dažnai naudojamas kokybiniams bandymams arba cheminės sintezės metu stebint reakcijos kinetiką.

7.3. Kolonelinė chromatografija

7.3.1. Kolonelinės chromatografijos įranga

Normalaus slėgio kolonelinei chromatografijai naudojamos stiklinės ar plastikinės cilindro formos įvairaus skersmens ir aukščio kolonėlės. Kolonėlės dugne turi būti porėta membrana, sulaikanti kolonėlėje sorbentą, ir praledžianti judrią fazę (eliucijos buferį ir chromatografuojamas medžiagas). Komercinėms kolonėlėms sandarinti naudojamos porėto stiklo plokšteliės, pritvirtintos prie specialių nailoninių antgalių, leidžiančių reguliuoti kolonėlės tūrį. Laboratoriniams darbams dažnai naudojamos kolonėlės, užkimštos stiklo plaušų kamščiais. Kolonėlė plastikiniai vamzdeliais



7.1 pav. Chromatografinės kolonėlės:
a – laboratorinė kolonėlė, b – komercinė kolonėlė

sujungiamą su detektoriumi ir/ar frakcijų kolektoriumi (7.1 pav.) I šiuolaikinius aukštą slėgio chromatografus dedamos plieninės kolonėlės, atlaikančios aukštą slėgį ir labai greitai išskiriančios medžiagas

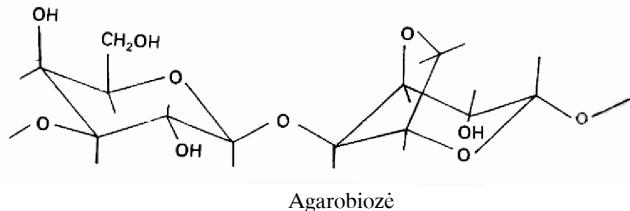
7.3.2. Nuostovioji fazė – užpildas/ sorbentas/nešiklis

Užpildu vadinama nuostoviąjā fazē sudaranti pagrindinę medžiagą. Ji, chemiškai modifikavus ar prijungus tam tikras funkcinės grupes, vadinama sorbentu arba nešikliu. Užpildo parinkimas svarbus sekmingai chromatografijai. užpildas turi būti mechaniskai ir chemiškai atsparus, neužkimšti kolonėlės, lengvai praleisti judrią fazę (eliuentą). Be to, užpildas turi turėti funkcinės grupes, kurias modifikujant galima būtų gauti skirtinį savybių nešiklius.

Pagrindiniai užpildai:

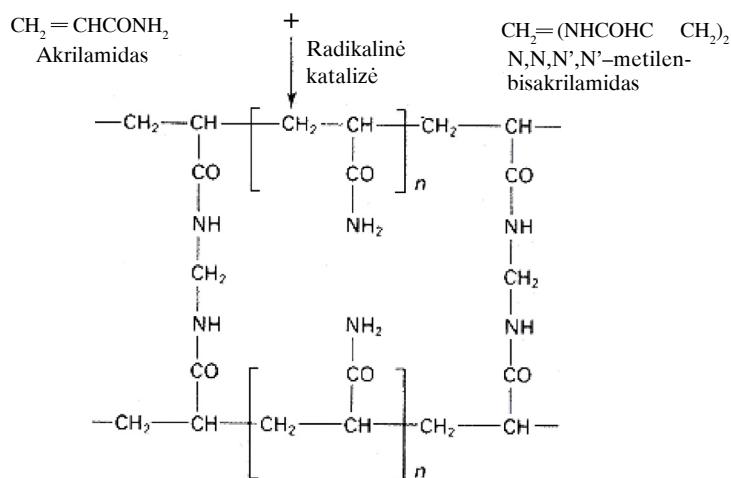
- **Agarozė** – polisacharidas, sudarytas iš pasikartojančių agarobiozės fragmentų. Agarobiozė yra disacharidas, sudarytas iš D-galaktozės ir 3,6-anhidrogalaktozės liekanų. Taip gaunamas skirtingo poringumo, stabilus pH pokyčiams agarozės gelis.

Komerciniai agarozės preparatai – *Sepharose* ir *Bio-GelA*.



- **Celiuliozė** – polisacharidas, sudarytas iš α -(1 $>$ 4)-glykozidiniais ryšiais susijungusių gliukozės liekanų. Naudojant epichlorhidriną, gaunama celiuliozė, kurios linijinės molekulės sujungiamos skersiniai ryšiais. Celiuliozė gaminama grūdeliai arba plaušinė, yra hidrofiliška ir stabili rūgštinėje bei šarminėje terpėse.
- **Dekstranas** – polisacharidas, sudarytas iš α -(1 $>$ 6)-glykozidiniais ryšiais susijungusių gliukozės liekanų. Skersiniams ryšiams sudaryti naudojamas epichlorhidrinas. Dekstranas, kaip užpidas, mažiau stabilus nei celiuliozė. Komercinis preparatas – *Sephadex*

Poliakrilamidas – akrilamido polimeras, „susūtas“ N,N,N’,N’-metilenbisakrilamidu. Tai labai patvarus polimeras. Komercinis preparatas – *Bio Gel P*



- **Polistirenas** – stireno polimeras, „susūtas“ divinilbenzenu. Polistirenas, naudojamas kaip užpildas jonų mainų chromatografijoje, yra stabilus rūgščių ir šarmų poveikui.
- **Silikagelis** – polimeras, sudarytas iš silicio rūgšties (*techn.* SiO2 \times nH2O, gelio pavidalio medžiaga). Šis polimeras labai hidrofiliškas, todėl silanolio –OH grupių perteklius yra blokuojamas, veikiant trichlormetilsilanu.

7.3.3. Kolonélés paruošimas ir eliucija

Chromatografijos sėkmę labai priklauso nuo taisyklingo kolonélés paruošimo. Sorbentas (nešiklis) yra suspenduojamas ir brinkinamas buferyje. Suspensija, švelniai maišant, lėtai pilama į kolonélę. Reikia nuolatos stebėti, kad buferio sluoksnis visada būtų virš nešiklio ir nepatektų oro burbuliukai. Pripildyta reikalingo sorbento kiekiu, kolonélė sandariai uždaroma, kad neišdžiūtų. Chromatografijai paruoštas medžiagų mišinys atsargiai plonu sluoksniu užpilamas ant nešiklio paviršiaus tokiu būdu, kad jis susigertų į viršutinį sorbento sluoksnį. Vėliau atliekama chromatografija. Pro kolonélę leidžiama judrioji fazė (buferis ar tirpiklis). Šitas procesas vadinamas **eliucija**. Pro kolonélę judėdamos skirtingos medžiagos atskirkiria ir iš kolonélés ištaka su skirtingu buferio (eliuato) tūriu. Judriosios fazės tūris, kuris reikalingas tam tikrai medžiagai išplauti (eliuoti) iš kolonélés, yra vadinamas eliucijos tūriu. Tekantis iš kolonélés buferis – eliuatas paprastai prateka detekcijos kiuvetę, kur yra nuolat matuojama sugertis, esant atitinkamam bangos ilgiui. Registracijos sistema savirašiu užrašo pratekančio tirpalą sugertį ir bražo eliucijos profilį, kuriame eliuojamos individualios medžiagos užrašomos tam tikrais „pikais“. Baltymų chromatografijos atveju matuojama sugertis, kai $\lambda = 280$ nm, nukleorūgštį, kai $\lambda = 250 - 260$ nm. Pratekėjęs detekcijos kiuvetę, eliuatas mažais tūriaus, frakcijomis, surenkamas automatiniu frakcijų kolektoriumi. Eliucijos būdas priklauso nuo chromatografijos metodo: jonų mainų chromatografijos metu dažniausiai naudojama gradientinė eliucija: kai keičiamas buferio joninė jėga arba keičiamas buferio pH; gelchromatografijos metu eliuojama vienu pasirinktu buferiu, nekeičiant buferio pH ar koncentracijos.

7.4 Plokšcioji (popieriaus ir plonasluoksnė) chromatografija

7.4.1. Popieriaus chromatografija

Vietoje kolonélés, kurioje nešiklis yra celiuliozė, gali būti naudojamas specialiai paruoštas chromatografinis popierius.

Popieriaus chromatografijos metodu galima atskirti vienus nuo kitų ir identifikuoti daugelį cheminių junginių, pvz., nukleozidus, nukleotidus bei aminorūgštis.

Popieriaus chromatografijai reikalingas chromatografinis popierius, chromatografinis cilindras ir tirpiklių sistema. Į chromatografijos cilindrą ipilama paruošta tirpiklių sistema, vėliau merkiamas į ritinį susuktas ir susegtas chromatografinio popieriaus lakštas, su užlašintos tiriamos medžiagos. Dažniausiai užlašinamos žinomos struktūros medžiagos kaip žymenys (kontroliniai taškai) – šalia tiriamos medžiagos. Chromatografijos procesas vyksta 15–20 val.: chromatografiniu popieriumi kyla tirpiklis (popierius pamažu drėgsta), ir kartu neša užlašintas ant popieriaus medžiagas. Tiriamų

medžiagų išsidėstymas chromatogramoje priklauso nuo cheminės jų prigimties ir tirpumo judriojoje bei nuostoviojoje chromatografinės sistemos fazėse. Šiuo atveju nuostoviosios fazės vaidmenį atlieka popieriaus lakštą sudarantis celiuliozės pluoštas ir tame surištas vanduo. Chromatografinių popierių gamina įvairios komercinės kompanijos, popieriaus savybės skiriasi. Atsižvelgiant į celiuliozinio pluošto tankį, chromatografinis popierius skirstomas į „greitą“, „vidutinio greičio“ ir „lėtajį“, nes skirtingu greičiu juo teka chromatografinė sistema. Popieriaus celiuliozė yra higroskopiška, į jos sudėtį įeina surištas vanduo, nors ir skrupulingai išdžiovinta. Medžiagų pasiskirstymas chromatografuojant popieriaus chromatografijos būdu vyksta tarp nuostoviosios fazės (celiuliozės surišto vandens) ir judrios fazės – organinio tirpiklio. Chromatografijai naudojamos tirpiklių sistemose taip pat yra vandens. Judriosios fazės funkciją atlieka įvairūs organiniai tirpikliai (izopropilo alkoholis, n–propanolis, n–butanolis, tretinis–butanolis, etanolis), įeinantys į chromatografines sistemas. Juo didesnis medžiagų tirpumas judriojoje fazėje (hidrofobinės medžiagos) ir juo mažesnis nuostoviojoje (hidrofilinės medžiagos), tuo greičiau tos medžiagos juda kartu su organiniu tirpikliu.

Ant chromatogramos (popieriaus lakšto) išsiskyrusios medžiagos nustatomos panaudojant įvairiais būdais. Chromatografuojamos spalvotos medžiagos nustatomos iš pasiskirsčiusių spalvotų dėmių, nespalvotas medžiagas galima ryškinti savitaisiais reagentais. Aminorūgštys ar peptidai ryškinami apipurškiant nihidrinu. Vietos, kuriose yra šios medžiagos, nusidažo violetine spalva. Nukleozidai, nukleotidai ar kitos medžiagos, sugeriančios UV šviesą, nustatomos chromatoskopu.. Šių medžiagų susitelkimo vietose matomos tamsios dėmės.

Atsižvelgiant į judriosios fazės judėjimo kryptį popieriaus chromatografija skirstoma į tris pagrindines rūšis – **ratinę, kylančią ir nusileidžiančią**.

7.4.2. Plonasluoksnė chromatografija

Plonasluoksnėi chromatografijai vietoje chromatografinio popieriaus naudojamos aliuminio, plastiko ar stiklo plokštélés, padengtos neorganinėmis medžiagomis – silikageliu (silicio oksidu), aluminio oksidu, magnio silikatu, ar organinės prigimties medžiagomis – celiulioze, polietileno ar kito polimero milteliais. Serbento, dengiančio plokštèles, sluoksnis būna 0,2–0,5 mm storio. Šiuo metu komercinės kompanijos gamina įvairaus dydžio ir skirtingais nešikliais padengtas plokštèles, kurias pagal poreikius galima panaudoti įvairiomis medžiagomis atskirti ar identifikuoti. UV–šviesą sugeriančių medžiagų (pvz., nukleotidų) chromatografijai skirtos plokštélés yra padengtos nešikliu, sumaišytu su savitu UV šviesoje švytinčiu dažu. Chromatogramos vietas, kuriose yra nukleotidinės prigimties medžiagos, apšvietus UV šviesa, yra tamsios, o chromatografinės plokštélés fonas švyti. Aminorūgštys ant chromatografinių plokštelių

ryškinamos ninhidrinu. Chromatografijos principas naudojant plokšteles yra panašus į popieriaus chromatografiją, tik nešiklis iš dalies atlieka ir sorbento funkcijas. Plonasluoksnė chromatografija yra daug greitesnė ir reikia labai mažai tiriamos medžiagos. Ši chromatografija vyksta tik 1–2 val., nes tirpiklių sistema plokšteliems kyla labai greitai.

7.5. Chromatografijos metodai

7.5.1. Adsorbcinė chromatografija

Ši chromatografija grindžiama adsorbcijos principu: kai netirpios medžiagos – nešikliai/absorbentai – ant savo paviršiaus sugeba sulaikyti ištirpusias molekules. Tai adsorbcijos procesas, paremtas silpnais tarpmolekuliniais ryšiais – van der Valso sąveika, vandeniliniais ryšiais, bet ne joniniais ar kovalentiniais ryšiais. Adsorbcinė chromatografija dažniau naudojama mažos molekulinės masės medžiagoms atskirti.. Šios chromatografijos principas taikomas ne tik kolonėlinei, bet ir plonasluoksnei chromatografijai. Adsorbcinei chromatografijai dažniausiai naudojami nešikliai pateikti 7.1 lentelėje.

7.1 lentelė. Adsorbcinės chromatografijos nešikliai

Nešiklis/sorbentas	Atskiriamos medžiagos
Aliuminio oksidas	Mažos molekulinės masės organinės medžiagos, peptidai
Silikagelis	Aminorūgštys, nukleotidai, steroidai
Aktyvintosios anglys	Angliavandeniniai, aminorūgštys, peptidai
Kalcio fosfatinis gelis	Baltymai, polinukleotidai
Hidroksiapatitas	Nukleorūgštys, oligonukleotidai

7.5.2 Pasiskirstymo chromatografija

Šis chromatografijos būdas dar vadinamas skysčių chromatografija, nes nuostovioji ir judrioji fazės yra skysčiai. Medžiagų pasiskirstymas tarp nuostoviosios ir judriosios fazių grindžiamas gimininingumo (tirpumo) skirtumu. Didžiausia chromatografuojamos medžiagos koncentracija bus tame skysteje, kuriame ji geriausiai tirpsta. Nuostoviosios fazės skystis gali būti porėto nešiklio grūdeliuose, panašiai kaip gelchromatografijos atveju (sk. 3.4.), gali būti surištas su nešiklio pluošto, kuriuo priplūdyta kolonėlė, arba gali plonu sluoksniu padengti nuostoviosios fazės nešiklio grūdelius. Hidrofiliniai nešikliai – celuliozė, poliakrilamidas, deksranas brinkdami suriša daug vandens, kuris atlieka nuostoviosios fazes funkciją.. Judrioji fazė šiuo atveju yra organinių tirpiklių mišinys.

Nuostovioji fazė popieriaus chromatografijoje taip pat yra vanduo, surištas su chromatografinio popieriaus celiuliozės pluoštu, o judrioji fazė – organinių tirpiklių mišinys. Chromatografuojamų medžiagų pasiskirstymas priklauso nuo jų hidrofobiškumo. Atliekant popieriaus chromatografią, geriau organiniuose tirpikliuose tirpstančios medžiagos visada juda toliau su tirpiklių mišiniu, o hidrofilinės medžiagos atsilieka, nes yra giminingesnės vandeninei fazei.

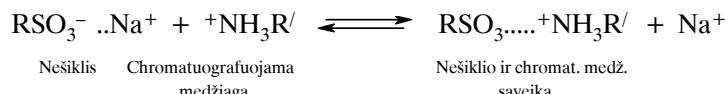
Kai kada pasiskirstymo chromatografijos fazės parenkamos atvirkščiai, t. y., prie nešiklio plonu sluoksniu adsorbuojamas ar cheminiais ryšiais prijungiamas organinis tirpiklis, o judrioji fazė yra vandenis tirpalas. Šis būdas vadinamas atvirkštinės fazės chromatografija (*reversed phase chromatography*).

7.5.3. Jonų mainų chromatografija

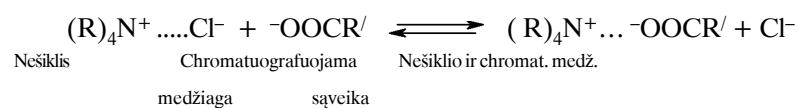
Ši chromatografija grindžiamai sąveika tarp skirtingus krūvius turinčių molekulių. Daugelis biologiškai aktyvių junginių – baltymai, nukleorūgštys – turi funkcinės grupės, kurios vandeniniuose tirpaluose gali jonizuotis, t. y. igyti teigiamą arba neigiamą krūvį. Krūvis priklauso nuo funkcinės grupės pK_a ir nuo buferio pH. Jonų mainų chromatografijai naudojami jonų mainų nešikliai turintys galinčiais jonizuotis funkcinės grupės. Šie nešikliai būna katijoniniai arba anijoniniai. Katijonų mainų nešikliai neigiamajį krūvį turinčios funkcinės grupės sąveikauja su chromatografuojamų medžiagų katijoninėmis grupėmis. Šie nešikliai dar vadinami rūgštiniais jonų mainų nešikliais, nes neigiamas jų krūvis priklauso nuo rūgštinių funkcinės grupės ionizacijos. Anijonų mainų nešikliai turi teigiamajį krūvį, jie vadinami baziniais nešikliais, nes teigiamajį krūvį generuoja protoną prisijungusios bazinės funkcinės grupės.

Jonų mainai vyksta keliais etapais, jų pasikeitimas yra pusiausvirasis procesas:

Katijonų mainai:



Anijonu mainai;



Pagrindiniai jonų mainų chromatografijoje naudojami nešikliai pateikiami 7.2 lentelėje.

7.2 lentelė. Pagrindiniai jonų mainų nešikliai

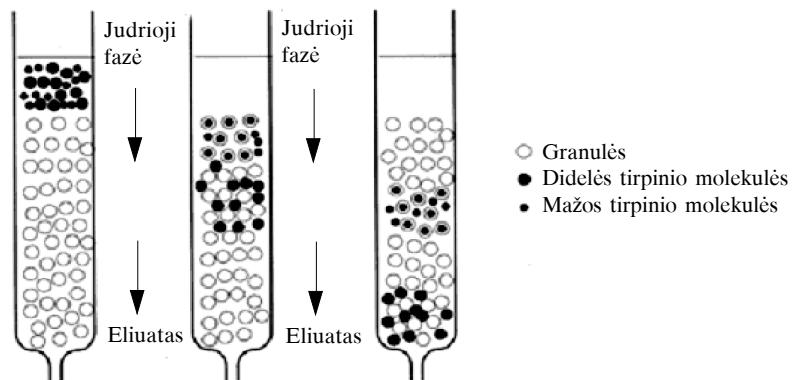
Nešiklio rūšis	Užpildas	Funkcinė grupė	Funkcinės grupės pavadinimas
Katijonų mainų (silpnai rūgštiniškiai)	Agarozė Celiuliozė Dekstranas Poliakrilatas	$-COO^-$ $-CH_2COO^-$	Karboksi- Katrбoksimetil-
Katijonų mainų (stipriai rūgštiniškiai)	Celiuliozė Dekstranas Polistirenas	$-SO_3^-$ $-CH_2SO_3^-$ $-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$	Sulfo- Sulfometil- Sulfopropil-
Anijonų mainų (silpnai bazinės)	Agarozė Celiuliozė Dekstranas Polistirenas	$-CH_2CH_2N^+H_3$ $-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$	Aminoetil- Dietilaminoetil-
Anijonų mainų (stipriai bazinės)	Celiuliozė Dekstranas Polistirenas	$-CH_2N^+(CH_3)_3$ $-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_3$	Trimetilaminometil- Trietilaminoetil-

Visus joninius nešiklius charakterizuoją **bendroji joninė talpa**, kurią apibrėžia galimų pakeisti jonų miliekvivalentų skaičius vienam gramui sausojo nešiklio arba hidratuoto nešiklio vienam tūrio vienetui.

Parenkant chromatografijai nešiklį, atsižvelgiama į tiriamo pavyzdžio sandų stabilumą, santykinę molekulinę masę ir savitulosius atskyrimo poreikius. Biologiskai aktyvios medžiagos, ypač balytma ir fermentai, yra stabilūs tik siaurame pH intervale. Todėl balytų chromatografijai parenkami jonų mainų nešikliai atrankūs tame pH intervale. Eliucijai parenkami tokie buferiai, kad pH būtų artimas chromatografuojamo mišinio izoelektriniam taškui. Eliucijai naudojami to paties pH, bet skirtinges Jonų koncentracijos buferiai (gradientinė eliucija), arba keičiamas buferio pH.

7.5.4. Molekulių išskyrimo chromatografija (gelchromatografija)

Molekulių atskyrimas pagal jų dydį ir formą grindžiamas molekuliniu sieto principu: molekulės atskiriamos tam tikro skersmens (dydžio) poras turinėjais nešikliais. Chromatografijos būdas, kai naudojamos gelinės polimerinės medžiagos, vadintamas **gelchromatografija** arba **gelfiltracija**. Šis chromatografijos principas yra labai paprastas. Kolonėlė pripildoma porėto stiklo ar gelio mažujų grūdelių (mikrogranulėmis), suspenduotų judriosios fazės buferyje. Ant kolonėlės užpilamas skirtingo dydžio molekulių mišinys. Didelės molekulės iš kolonėlės eliuojamos pirmiausia, nes jos nepatenka į nešiklio poras ir iš kolonėlės išstumiamos. Mažesnės molekulės pasiskirsto atitinkamo dydžio gelio porose ir iš kolonėlės eliuojamos, išsisijoja pagal dydį viena paskui kitą, 7.2 pav.



7.2 pav.. Skirtingo dydžio molekulių atskyrimas gelchromatografijos būdu

Gelchromatografijai naudojami nešikliai pateikti 7.3 lentelėje.

7.3 lentelė. Pagrindiniai gelchromatografijos nešikliai

Polimeras	Prekybinis pavadinimas		Atskiriamų medžiagų molekulinė masė ¹⁾ $M_n \times 10^{-3}$
Dekstranas	Sefadeksas (<i>Sephadex</i>)	G-10 G-25 G-50 G-75 G-100 G-200	<0,7 1,0–5 1,4–30 3–80 4–150 5–600
Dekstranas	Sefakrilas (<i>Sephacryl</i>)	S-200 S-300 S-400	5–250 10–1500 20–8000
Agarozė	Sefarozė (<i>Sepharose</i>)	6B 4B 2B	10–4000 60–20 000 70–40 000
Agarozė	Biogelis (<i>Bio-Gel</i>)	A5m A15m A50m A150m	10–5000 40–15000 100–50 000 1000–150 000
Poliakrilamidas	Biogelis (<i>Bio-Gel</i>)	P2 P6 P30 P100 P300	0,1–0,8 1–6 2,5–40 5–100 60–400

1) nustatyta globuliniams balytmams, apytikriaai vienoda viengrandėms nuklorūgštims bet mažesnė fibriliniams balytmams ir dvigrandėms DNR

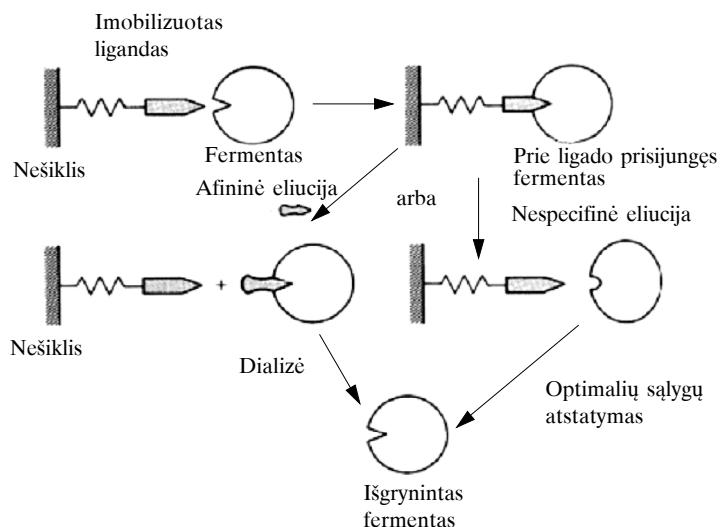
Gelchromatografijos taikymas:

- **Gryninimas.** Biologinėms makromolekulėms grynininti, atskirti nuo mažesnių ar didesnių molekulių. Naudojant įvairias porėto stiklo grūdelius ar skirtingus gelinius nešiklius galima išskirti ir išgryninti virusus, baltymus, fermentus, nukleorūgštis, polisacharidus, antikūnus.
- **Molekulinei masei nustatyti.** Globulinų baltymų eluciujos buferio tūris priklauso nuo baltymo molekulinės masės. Praleidus pro kolonėlę žinomas molekulinės masės baltymus ir išmatavus jų eliuato tūri, galima sudaryti kalibravimo kreivę – nustatyti santykinę nežinomą baltymo molekulinė masė.
- **Tirpalų koncentravimas** Didelės molekulinės masės molekulių praskiesti tirpalai (pvz. aktyvaus išgryntinto fermento preparatas) galėtų būti sukonzentruotas pridėjus sauso, biraus sefadekso G-25. Vandenį ir mažos molekulinės masės molekules sugers sefadekso grūdeliai, o didelės molekulės liks tirpale. Vėliau gelį pašalinti centrifuguojujant.
- **Nudruskinimas** Panaudojant sefadekso G-10 ar G-25 kolonėles galima atskirti didelės molekulinės masės molekules nuo išdruskų, ir mažos molekulinės masės irimo (degradacijos) produktų. Nudruskinimo metodas yra daug greitesnis ir veiksmingesnis negu dializė. Taikant šį metodą, galima pašalinti fenolio priemaišas iš nukleorūgščių preparatų, amonio sulfatą po baltymų išsodinimo arba druskų perteklių po jonų mainų chromatografijos.

7.5.5. Giminingumo (afininė) chromatografija

Šis chromatografijos metodas buvo sukurtas fermentams iš gamtinių šaltinių išskirti ir gryniinti. Naudojant giminingumo chromatografiją, galima gauti ypač grynuos fermento preparatus. Vėliau šis metodas pritaikytas nukleorūgštims, imunoglobulinams, biologinių membranų receptoriams, atskiroms ląstelėms išskirti ir gryniinti. Naudojant šį chromatografijos būdą, reikia, kad išskiriamas iš baltymų mišinio fermentas savitai susijungtu su nešiklio **ligandu***. Eliujant buferiu, iš kolonėlės pirmiausia išteka visi neprisijungę baltymai ar peptidai, t. y. nesavitos ligandui medžiagos. Prisijungęs prie ligando fermentas iš kolonėlės išplaunamas keičiant eluciujos sąlygas. Naudojant **nespecifinę** (nesavitą) **eliuciją**, didinama buferio joninė jėga arba keičiamas pH. **Specifinės** (giminingumo) **eliucijos** atveju, iš eluciujos buferių dedama substrato arba fermento slopiklio (grīžtamojo), kurio giminingumas fermentui yra didesnis negu ligando. Tokiomis eluciujos sąlygomis nutraukiamas ligando ir fermento ryšys, ir grynas fermentas išplaunamas nuo kolonėlės. (7.3. pav.)

* **Ligandas** – tai prie pildo prijungtas (imobilizuotas) junginys, savitai sąveikaujantis su išskiriama makromolekule ar kita medžiaga (7.3 pav.).



7.3 pav. Fermento gryninimo schema naudojant giminingumo chromatografiją

Giminingumo chromatografijai yra labai svarbu pasirinkti tinkamą ligandą. Reikia žinoti išskiriamos medžiagos savybes, t. y. su kokios cheminės struktūros junginiai ji sudaro savituosius ryšius. Jei išskiriama medžiaga sąveika tik su vieninteliu ligandu, tai vadinama giminingumo (biospecifine) sąveika, pvz., fermentas su kofermentu. Dažniausiai naudojami ligandai giminingumo chromatografijai pateikiami 7.4 lentelėje.

7 4 lentelė. Giminingumo chromatografijos ligandai

Ligandas	Giminingumas
5'-AMP	Nuo NAD ⁺ priklausomos dehidrogenazės, kai kurios kinazės
2'5'-ADP	Nuo NADP ⁺ priklausomos dehidrogenazės
Kalmodulinas	Kalmoduliną prisijungiantys balymai
Avidinas	Balymai, turintys biotino
Riebalų rūgštys	Balymai, prisijungiantys riebalų rūgštis
Heparinas	Lipoproteinai, lipazės, DNR polimerazės, augimo faktoriai, serino proteazių (peptidazių) slopikliai
Balymai A arba G	Imunoglobulinai
Konkanavalinas A	Glikoproteinai, turintys a-D-gliukopiranozilo liekanas
Sojų lektinas	Glikoproteinai, turintys N-acetil- α -(arba β)-galaktopiranozilo liekanas
Fenilboronatas	Glikoproteinai
PoliA	RNR saviti balymai arba RNR, turinčios poli U sekas
Lizinės	rRNR
Cibachrono mėlynasis F3G-A	Balymai, prisijungiantys nukleotidus, koaguliacijos veiksniai

7.6. Aminorūgščių ir nukleotidų nustatymas

7.6.1. Plonasluoksnė chromatografija

Reagentai ir medžiagos

1. Plonasluoksnė chromatografinė plokštelynė.
2. Aminorūgščių tirpalai (1% , po 1 ml.).
3. Nukleozidų ir nukleotidų tirpalai (1% , po 1 ml.).
4. mikrošvirkštas arba stikliniai kapiliarai.
5. 0,1% ninhidrino tirpalas acetone.
6. Chromatografinė tirpiklių sistema – izopropilo alkoholis: konc. amoniakas: H₂O, v/v (7:1:2).
7. Chromatografinis cilindriukas.
8. Chromatoskopas (prietaisas, turintis UV lempą).

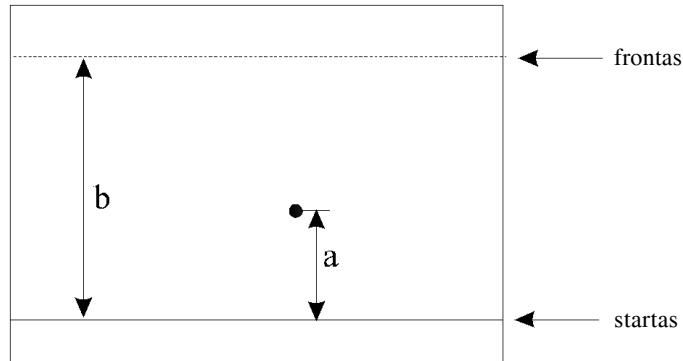
Darbo eiga

1. Paimama chromatografinė plokštelynė ir 0,5–1,0 cm atstumu nuo krašto nubréžiama starto linija (7.4. pav.).
2. Ant jos 1 – 2 cm nuotoliu vienas nuo kito stikliniu kapiliaru arba mikrošvirkštu (po 2–3 μ l) užlašinami tiriamų medžiagų mėginiai. Tai gali būti aminorūgštys, nukleotidai, nukleozidai ir nežinoma medžiaga. Palaukiama kol dėmės išdžiūsta.
3. Chromatografinė plokštelynė dedama į chromatografinį indą turintį tirpiklių sistemą. Tirpiklio išpilama į chromatografinio indo dugną tik tiek, kad įsimerkštų plokštelynės kraštas, bet tirpiklis nesiektų starto linijos.
4. Chromatografija atliekama 1–1,5 val., paskui plokštelynė išimama, pažymima „fronto“ linija, t. y. vieta, iki kurios sudrėkusi plokštelynė. Plokštelynė išdžiovinama traukos spintoje.
5. Plokštelynėse aminorūgščių susitelkimo vietas nustatomos, apipurškiant 0,1-0,2% acetoniniu ninhidrino tirpalu. Nukleozidai ir nukleotidai nustatomi apšviečiant chromatografatografinę plokštelynę UV šviesa. Šie junginiai sugeria UV šviesą, todėl chromatogramoje nukleozidų ar nukleotidų susitelkimo vietose matomos tamsios dėmės.
6. Išmatuojami a ir b nuotoliai (cm) ir apskaičiuojami pasiskirstymo koeficientai R_f. Pasiskirstymo koeficientas, tai :

$$\text{a. } R_f = a/b$$

Atstumas **a**—nuo starto linijos iki dėmės centro

Atstumas **b**—nuo starto linijos iki fronto linijos



7.4 pav. Plonasluoksnės chromatografinės plokštelės paruošimas

7. Palyginus žinomų ir tiriamų medžiagų pasiskirstymo koeficientus, sprendžiama, kokios nežinomos medžiagos buvo paimtos.

7.6.2. Ratinė popieriaus chromatografija

Reagentai ir prietaisai

1. Chromatografinis popierius.
2. Aminorūgščių tirpalai (1%, po 1 ml.).
3. Nukleozidų ir nukleotidų tirpalai (1%, po 1 ml.).
4. 0,1% ninhidrino tirpalas acetone.
5. Petri lėkštelė.
6. Mikrošvirkštas arba stikliniai kapiliarai.
7. Chromatografinė sistema – izopropilo alkoholis: konc. amoniakas : H₂O, v/v (7:1:2).

Darbo eiga

1. Ant chromatografinio popieriaus uždedama Petri lėkštelė, aplink ją pieštuku apibrėžiamas skritulys ir iškerpamas. Šio skritulio centre pieštuku nubrėžiamas 1 cm spindulio apskritimas ir nuo skritulio krašto iki jo centro įkerpama 1 cm pločio juosta (7.5 pav.). Ji naudojama kaip dagtis, įmerkti į chromatografinę sistemą.
2. Centrinis apskritimas yra starto linija, ant kurios vienodu nuotoliu viena nuo kitos kapiliaru arba mikrošvirkštu užlašinamos aminorūgštys (kontrolinai taškai) ir šalia tiriamą medžiaga. Kiekvienas medžiagos lašinama po 2-3 μl į tašką. Būtina užlašinti ypač mažais lašeliais ir palaukti, kol tos medžiagos lašelis išdžius.

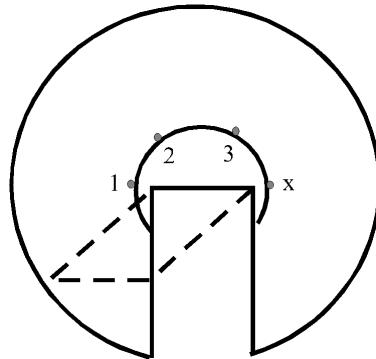
3. Užlašinus visus mèginius, chromatografinio popieriaus skritulys uždeamas ant Petri lèkstelès, į kurią įpilta chromatografinės tirpiklių sistemos. Skritulys turi laikytis ant Petri lèkstelès kraštų, o dagtis įmirkti į chromatografinę sistemą.
4. Taip paruošta chromatograma užden-giama dangteliu ir paliekama 1,5-2 val., kol tirpiklio frontas pasiekia popieriaus kraštą.
5. Tada chromatograma išimama, pažymima fronto linija (sudrèkusios chromatogramos krašto linija), išdžiovinama traukos spintoje ir apipurškiama 0,1-0,2% ninhidrino tirpalu (jei užlašintos aminorùgštys). Ninhidrinà reikia purkšti atsargiai, geriausiai užsimovus gumes pirštines, nes ninhidrinas išryškins ne tik ant chromatogramos esančias aminorùgtis, bet ir pirštus nudažys violetine spalva.
6. Apipurkšta chromatograma palaikoma 10 min. džiovinimo spintoje, aminorùgšcių susitelkimo vietose išryškėja violetinës dêmës.
7. Pamatujamai a ir b nuotoliai (cm) ir apskaičiuojamai pasiskirstymo koeficientai R_f . Pasiskirstymo koeficientas, tai:

$$R_f = a/b$$

Nuotolis **a** – nuo starto linijos iki dêmës centro

Nuotolis **b** – nuo starto linijos iki fronto linijos

Šis koeficientas taip pat apskaičiuojamas ir nežinomas aminorùgties. Palyginus visus koeficientus, sprendžiama, kokios buvo nežinomas aminorùgštys.



7.5 pav. Ratinës chromatogramos paruošimas

7.6.3. Kylamoji chromatografija

Reagentai ir prietaisai

1. Chromatografinis popierius.
2. Tam tikrù aminorùgšcių tirpalai (1%, po 1 ml).
3. Nukleozidų ir nukleotidų tirpalai (1%, po 1 ml).
4. Mikrošvirkštas arba stikliniai kapiliarai.
5. 0,1% ninhidrino tirpalas acetone.
6. Chromatografinë sistema – izopropilo alkoholis: konc. amoniakas : H₂O, v/v (7:1:2).

7. Chromatografinis cilindras.
8. Chromatoskopas (prietaisas turintis UV lempą).

Darbo eiga

17. Kylamoji popieriaus chromatograma paruošiama panašiai kaip chromatografinė plokštėlė, tik naudojamas chromatografinis popierius.
 - a. Ant chromatografinio popieriaus lapo ($30 \times 30\text{cm}$) 3 cm nuotoliu nuo krašto nubréžiama starto linija.
 - b. Ant jos 2–5cm atstumu viena po kitos stikliniu kapiliaru arba mikrošvirkštu ($5 - 10\mu\text{l}$) užlašinama tiriamų medžiagų tirpalu. Tai gali būti aminorūgštys, nukleotidai, nukleozidai ir nežinoma medžiaga.
 - c. Palaukiama kol dėmės išdžiūsta, vėliau chromatografinis popierius susukamas ir susegamas į cilindrą, dedamas į chromatografinį indą, turintį tirpiklių sistemą. Tirpiklio išpilama į indo dugną tik tiek, kad išimerkštų chromatografinio popieriaus kraštas, bet tirpiklis nesiektų starto linijos.
 - d. Chromatografija atliekama 12-18 val., paskui chromatograma išimama, pažymima fronto linija, išdžiovinama kambario temperatūroje traukos spintoje.
 - e. Popieriaus chromatogramose aminorūgščių susitelkimo vietas nustatomos, apipurškiant chromatogramą 0,1% acetoniniu ninhidrino tirpalu. Nukleozidai ir nukleotidai chromatogramoje nustatomi apšviečiant chromatogramą UV šviesa, nes šie junginiai sugeria UV šviesą, todėl chromatogramoje nukleozidų ar nukleotidų susitelkimo vietose yra tamsios dėmės.
 - f. Apskaičiuojami R_f -pasiskirstymo koeficientai.

$$\mathbf{i. R_f = a/b}$$

Nuotolis **a** – nuo starto linijos iki dėmės centro

Nuotolis **b** – nuo starto linijos iki fronto linijos

Palyginus žinomų ir tiriamų medžiagų pasiskirstymo koeficientus, sprendžiama, kokios nežinomas medžiagos buvo užlašintos ant popieriaus chromatogramos.

Skirtingų aminorūgščių, nukleotidų ar nukleozidų pasiskirstymo koeficientas R_f , nerá vienodas Jis priklauso nuo tiriamų medžiagų struktūros ir chromatografijos sąlygų: tirpiklių sistemas, temperatūros, popieriaus rūšies.

Nusileidžiamoji chromatografija yra analogiška kylamajai, tik popieriaus lakštas chromatografiniame inde dedamas „žemyn galva“, t. y. pritvirtinamas taip, kad tirpiklis popieriumi teka žemyn, o ne kyla į viršų. Ši chromatografija vyksta šiek tiek greičiau, nei kylamoji, bet medžiagų pasiskirstymo principas yra tokis pat.

7.7. Mėlynojo dekstrano nudruskinimas gelchromatografijos metodu

Gelchromatografija grindžiamai molekulių išsijojimo principu, kuriam naudojamos polimerinės – gelinės medžiagos, turinčios skirtingo dydžio poras (7.5.4.sk).

Darbo tikslas: gelchromatografijos būdu nudruskinti mėlynojo dekstrano preparatą.

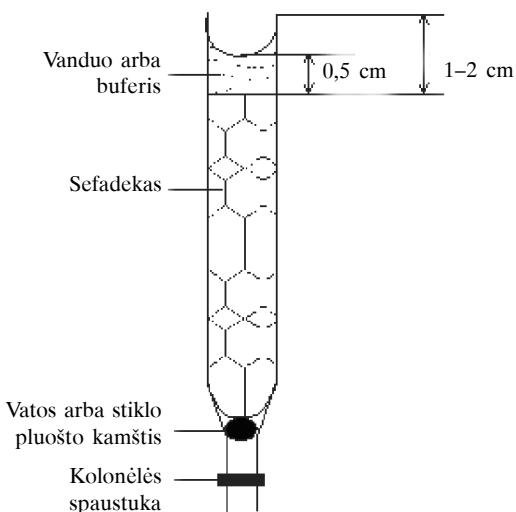
Reagentai ir prietaisai:

1. Išbrinkintas sefadeksas G–10, G–25 ar kitas gelfiltracijai tinkamas nešiklis.
2. $K_2Cr_2O_7$ (druska).
3. Mėlynasis dekstranas (polisacharidas, kurio molekulinių masė 2×10^6 Da.).
4. Kolonėlė.
5. Mégintuvėliai.
6. Fotoelektrokolorimetras arba spektrofotometras.

Darbo eiga

7.7.1. Kolonėlės pildymas

1. Apatinis kolonėlės galas (jei nėra stiklo tarpinės) užkemšamas stiklo vatos gumulėliu taip, kad pro jį galėtų tekėti vanduo, bet nepraleistų mažųjų sorbento grūdelių.
2. Kolonėlė tiksliai stačiai įtvirtinama stove, ir atsargiai pilant išbrinkinto nešiklio suspensiją pripildoma (7.6 pav.).



7.6 pav. Gelchromatografijos (gelfiltracijos) kolonėlė

3. Pilant nešiklio suspensiją, kolonélės spaustuvas turi būti atidarytas, kad pratekėtų vanduo., tačiau reikia stebėti, kad virš nešiklio kolonélėje visada būtų apie 0,5 cm vandens sluoksnis (kolonélėje nešiklis negali būti sausas).
4. Pripildžius kolonélę, spaustukas užspaudžiamas.

7.7.2. Pavyzdžio paruošimas ir užpylimas ant kolonélės

1. Paruošiamas tokios sudėties tirpalas: 1 ml 5% $K_2Cr_2O_7$, kuriame ištirpinamas mėlynasis dekstranas. Dekstrano koncentracija mišinyje turi būti 0,5% (gaunamas spalvotas mišinys).
2. Prieš lašinant medžiagą mišinį ant kolonélės, reikia kolonélės spaustuvą lėtai atsukti, kad vanduo nuo nešiklio paviršius nutekėtų ir liktų tik minimalus sluoksnis.
3. Tada, ant nešiklio paviršiaus pagal kolonélės sienelę automatine pipete užpilama 1 ml paruošto spalvoto medžiagų mišinio (nesuplakti ir nepažeisti nešiklio sluoksnio). Šis mišinys turi susigerti į nešiklį. **Neleiskite išdžiūti kolonélei!**
4. Chromatografuojamam mišiniui susigérus, ant kolonélės atsargai pilamas vanduo. Šioje chromatografijoje vanduo (judriojį fazę), tekėdamas pro nešiklį (nuostovioji fazę) eliuoja užpiltas medžiagas.
5. Pratekantį tirpalą, mažais tūriais – frakcijomis (po 2 – 3 ml) galima surinkti į atskirus graduotus mėgintuvėlius ir pamatuoti frakcijų sugertį fotoelektrokolorimetru (FEK) arba spektrofotometru.
6. Frakcijas, kuriose yra $K_2Cr_2O_7$ (geltonos/oranžinės spalvos) matuojamos Nr.4 filtru, o mėlynos spalvos (dekkstrano) frakcijos Nr.7.filtru Spektrofotometru matuojama, atitinkamai, kai $\lambda = 440$ nm ir $\lambda = 590$ nm.
7. Remiantis matavimų duomenis, nubraižomas sugerties priklausomumo nuo pratekėjusio vandens tūrio grafikas.

7.8. Hemoglobino molekulinės masės nustatymas gelchromatografijos būdu

Biocheminių tyrimų metu molekulinę balytmų masę galima nustatyti gelchromatografijos (7.5.4. sk), NDS–PAGE elektroforezės (xxx sk.) ir ultracentrifugavimo tankio gradientu metodais.

Gelchromatografijos metodu balytmų molekulės frakcionuojamos atsižvelgiant į dydį, todėl galima nustatyti apytikrią molekulinę masę. Oligomeriniai balytmai gelchromatografijoje neišsiskiria į atskirus subvienetus, todėl nustatoma bendra oligomerinio balytmo molekulinė masė. NDS elektroforezės (elektroforezė denaturavimo sąlygomis) būdu frakcionuojant balytus, oligomeriniai balytmai denatūruoja ir gelyje matomi atskiri polipeptidai (balytmo subvienetai).

Šio darbo metu, naudojant sefadekso G-75 kolonélę nustatoma molekulinė hemoglobino masė. Molekulinė masė apskaičiuojama iš (1) formulės:

$$\lg M = 5,624 - 0,752 V_e/V_o, \quad (1)$$

M – molekulinė masė; V_e – eliuato tūris, kuriame iš kolonélės ištaka hemoglobinas; V_o – tarpgrūdelinis arba laisvasis kolonélės tūris.

Konstantos 5,624 ir 0,752 nustatyti bandymais. Norint nustatyti V_o , į kolonélę įpilamas mažas kiekis didelės molekulinės masės medžiagos tirpalui. Vėliau kolonèle leidžiamas eluentas. Eliuato tūris, kuriame iš kolonélės ištaka didelės molekulinės masės medžiaga, ir yra tarpgrūdelinis tūris V_o . Šiam tikslui dažniausiai yra naudojamas mėlynasis dekstranas, kurio molekulinė masė 2×10^6 Da.

Reagentai ir prietaisai

1. 0,1 M NaCl turinti 0,02% NaN₃ – 500 ml.
2. 1% hemoglobino tirpalas 0,1 M NaCl, turintis 0,02% NaN₃ – 1 ml. Prieš naudojimą šį tirpalą centrifuguoti 5 min staline centrifuga.
3. 1% mėlynojo dekstrano tirpalas 0,1 M NaCl, turinčio 0,02% NaN₃ – 1 ml. Prieš naudojimą šį tirpalą centrifuguoti 5 min. staline centrifuga.
4. 13,5 cm³ tūrio kolonélė, pripildyta sefadekso G-75 ir praplauta 0,1M NaCl tirpalu turinčiu 0,02% NaN₃.

Darbo eiga:

7.8.1. Sefadekso G-75–kolonélės V_o nustatymas:

1. Atspaudžiamas kolonélės spaustukas ir nuleidžiamas iš kolonélės tirpalas, esantis virš nešiklio taip, kad paviršius nebūtų sausas.. Vėliau spaustukas užspaudžiamas.
2. Ant gelio paviršiaus atsargiai pagal kolonélės sienelę įpilama 0,2 – 0,5 ml centrifuguoto mėlynojo dekstrano tirpalui ir atspaudžiamas kolonélės spaustukas; leidžiama mėlynajam dekstrano tirpalui susigerti į kolonélėje esantį nešiklį.
3. Kai tik mėlynasis dekstranas įsiskverbia į nešiklį, atsargiai pipete pagal kolonélės sienelę pilamas eliucijos tirpalas (0,1 M NaCl su 0,02% NaN₃) tokiu būdu iš kolonélės eliuojamas dekstranas. Ištakantis iš kolonélės nespalvotas eliuatas surenkamas į 10 ml tūrio matavimo cilindrą arba graduotą mègintuvėli. Kai eliucijos metu iš kolonélės pradeda tekėti mėlynas tirpalas, jis surenkamas į atskirus mègintuvėlius labai mažomis frakcijomis po 5 lašus.
4. Eliuatas iš šių mègintuvėlių (**pradedant nuo pirmosios frakcijos ir baigiant mègintuvėliu , turinčiu pačią ryškiausią spalvą** (spalvos ryškumą galima nustatyti matuojant spektrofotometru, λ 670 nm)^{*}, supilama į matavimo cilindrą,

^{*} Matavimui mèginiai paruošiami tokiu būdu: iš mègintuvėlių, kurių eliuato spalvos ryškumas bus matuojamas, paimama po 100 μ l eliuato, supilama į atskirus mègintuvėlius ir pridedama po 1ml vandens. Matuoti esant λ 670 nm arba λ 440 nm.

kur yra surinktas nespalvotas eliuatas. Tos eliuato frakcijos, kurių spalvos ryškumas pradeda silpnėti, neįskaitomos.

Eliuato tūris ml, kuris surinktas nuo eliucijos pradžios iki ryškiausios frakcijos, ir yra tarpgrūdelinis arba laisvasis kolonélės tūris – V_o .

7.8.2. Sefadekso G-75–kolonélės V_e nustatymas:

1. Kartojamas V_o nustatymo atveju aprašytas bandymas, tik vietoje mėlynojo dekstrano į kolonélę įpilama 0,5 ml centrifuguoto 1% hemoglobino tirpalo.
Eliuato tūris, surinktas nuo bandymo pradžios iki frakcijos, turinčios ryškiausią rožinę spalvą, yra V_e . (Spalvos ryškumą galima nustatyti matuojant spektrofotometru, λ 440 nm)^x
2. Apskaičiuojama hemoglobino molekulinė masė iš (1) formulės.
3. Baigus darbą, kolonélė plaunama 0,1 M NaCl, turinčiu 0,02% NaN₃ tirpalu ir saugoma užspaudus spaustuką. Virš nešiklio paviršiaus turi būti apie 1 cm aukščio skysčio stulpelis.

Literatūra

1. Principles and Techniques of Practical Biochemistry, (2003), Cambridge Univ. press, p.619–689
2. Інðаðи áí È.À. Õðñ àðrāðàôèý áâëëîâ è íóëëâèíîâûð êèñëîð, (1985), Íaóêà, Ì ñêâà, p.145–154.

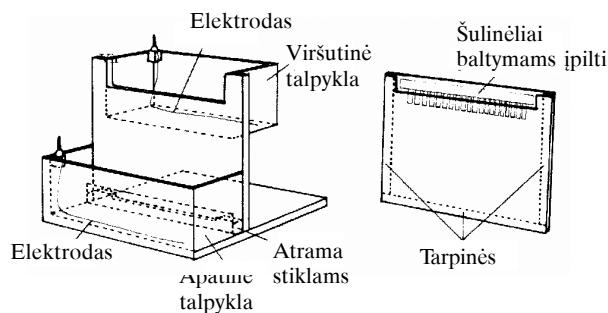
* Matavimui mèginiai paruošiami tokiu bûdu: iš mègintuvėlių, kurių eliuato spalvos ryškumas bus matuojamas, paimama po 100 μ l eliuato, supilama į atskirus mègintuvėlius ir pridedama po 1ml vandens. Matuoti esant λ 670 nm arba λ 440 nm.

8. Baltymų elektroforezė

Elektroforezės metu įkrautos molekulės juda elektriniame lauke. Šis metodas labai plačiai taikomas biomolekulėms atskirti ir apibūdinti. Įkrautų molekulių judrumas elektriniame lauke priklauso nuo jų dydžio ir formos, krūvio ir cheminės prigimties. Biologinių makromolekulių (baltymų, nukleorūgščių) elektroforezė dažniausiai yra atliekama buferiais prisotintuose geliuose (poliakrilamido, agarozės). Molekulių judrumas tokiuose geliuose priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo ir gelio porų dydžio.

Elektroforezės metu galima frakcijuoti molekulių mišinius, nustatyti tiriamos medžiagos grynumą, sužinoti molekulines baltymų mases. Elektroforezę galima atliki gulsčiose arba stačiose gelių plokštelių. Ji būna vienkryptė ir dvikryptė. Dvikryptės elektroforezės metu iš pradžių baltymai yra atskiriami izoelektrinio fokusavimo būdu. Toliau toje pačioje gelio plokštelių, statmenai pirmai krypciai, atliekama elektroforezė. Atliekant dvikryptę elektroforezę, galima sužinoti ne tik baltymų molekulių dydį, bet ir jų krūvį. Dvikryptė elektroforezė yra galingas metodas sudėtingiemis baltymų mišiniams frakcijuoti ir plačiai taikomas proteomikoje. Atlirkus vienkryptę ar dvikryptę baltymų elektroforezę ir elektroeliucijos ar elektropernešimo būdais perkélus juos ant polibrenu (heksadimetrinbromidas) aptrauktų stiklo pluošto lapelių arba polivinilidendifluorido (PVDF) membraninių filtrų, galima nustatyti norimų baltymų aminorūgščių sekas. Šie metodai yra suderinami su aminorūgščių sekų nustatymu dujinės fazės baltymų sekoskaičiais (sekvenatoriais).

Baltymų elektroforezė gali būti nenutrūkstamoji ir nutrūkstamoji. Nenutrūkstamosios elektroforezės metu elektriniame lauke nagrinėjamos molekulės juda gelyje, prisotintame tam tikros koncentracijos ir pH buferio. Baltymams atskirti dažniausiai taikomas nutrūkstamas gelelektroforezės metodas, 1970 m. aprašytas Lemli.

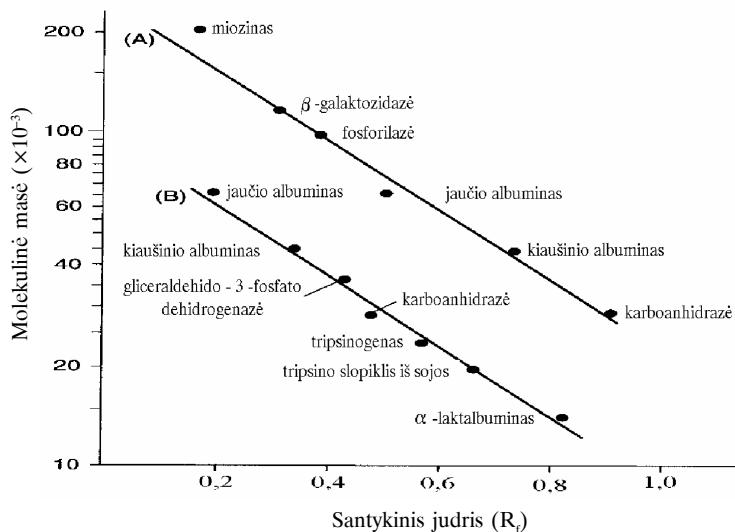


8.1 pav. Statusinis baltymų elektroforezės aparatas

Nutrūkstamos elektroforezės metu baltymų molekulės iš pradžių juda koncentruojamuoju geliu, turinčiu didelę poras ir vėliau pereina į gelį, turintį daug mažesnes poras. Nutrūkstamos elektroforezės metu baltymų mišinys yra sukoncentruojamas į siaurą juostelę, todėl į šulinėlius galima pilti ir daugiau praskiestus baltymų tirpalus negu nenutrūkstamos elektroforezės atveju. Koncentruojamasis ir skiriamasis gelai yra prisotinami skirtingos koncentracijos ir pH buferiais. Šiuose geliuose gaunamas ir skirtinges itampos gradientas. Koncentruojamajame gelyje esančiame buferyje yra chloro jonų (pagrindiniai), kurių elektroforezinis judris yra daug didesnis už baltymų molekulių judrį. Elektroforezės buferyje yra glicino jonų (atsiliekantieji), kurių elektroforezinis judris yra mažesnis už baltymų molekulių judrį. Elektroforezės metu greitai judantys jonai palieka mažo laidumo sritį, esančią tarp jų pačių ir judančių baltymų molekulių, ir šioje srityje padidėjusi itampa verčia baltymų molekules greičiau judëti. Tokiu būdu srityje tarp pagrindinių ir atsiliekančiųjų jonų, judančių baltymų molekulės yra sukoncentruojamos į siaurą juostelę, kuria jeina į skiriamąjį gelį. Palyginti su koncentruojamuoju geliu, skiriamojo gelio poros yra mažos, ten esančio buferio koncentracija ir pH reikšmė yra didesnė. Šiame gelyje glicino (atsiliekantieji) jonai juda tuo pat už baltymų molekulių ir baltymų judrumas gelyje priklauso tik nuo jų molekulių dydžio (denatūravimo sąlygomis) arba molekulių formos, dydžio ir krūvio (nedenatūravimo sąlygomis). Nedenatūruojantys gelai yra naudojami „igimtiems“ baltymams išskirti ir tirti. Prieš elektroforezę denatūravimo sąlygomis baltymai veikiami mažos molekulinių masės merkapto junginiai (2-merkaptoetanolui ar ditiotreitolui) ir natrio dodecilsulfatu (NDS), kaitinant verdančio vandens vonioje. Merkapto junginiai redukuoja disulfidinius tiltelius, esančius baltymo molekulėje. Dėl hidrofobinės sąveikos natrio dodecilsulfatas prisijungia prie denatūravusių polipeptidų. Daugumai baltymų 1,4 mg natrio dodecilsulfato prisijungia prie 1 mg baltymo. Disociavusių sulfogrupių perteklius suteikia polipeptidams didelį neigiamąjį krūvį. Daugumai baltymų neigiamo krūvio dydžio ir baltymo masės santykis yra pastovus. Dėl atostūmio jėgų tarp neigiamai iškrautų disociavusių dodecilsulfato liekanų polipeptido grandinė igauna elipsoido formą. Šio elipsoido dydis priklauso nuo polipeptido grandinės ilgio. Elektroforezės metu dodecilsulfato ir polipeptidų kompleksų judėjimo greičiai poliakrilamido gelyje priklauso tik nuo jų dydžių.

Baltymų molekulės atsiškirkia poliakrilamido gelyje, turinčiame 5–15 % akrilamido ir 0,2–0,5 % *N,N'*-metilenbisakrilamido. Šiomis sąlygomis yra stebima

tiesinė priklausomybė tarp santykinio baltymų molekulių elektroforezinio judrio ir jų molekulinių masių logaritmo (8.2 pav.).



8.1. Elektra ir elektroforeze

Reikia žinoti, kad elektros srovės stiprumas ir įtampa, kuri yra sukuriama elektroforezės metu, yra pavojinga žmogaus gyvybei. Taigi dirbant privalu laikytis saugaus darbo taisyklių:

1. Elektroforezės aparato apsauginį dangtelį galima uždėti arba nuimti tik tuomet, kai maitinimo šaltinis yra išjungtas. Niekada abiejomis rankomis neuždėkite ir nenuimkite elektroforezės aparato apsauginio dangtelio, nes gali susidaryti potencialiai mirtina elektros grandinė (per abi rankas krūtinės ląsta ir širdis susijungia su neizoliuotais laidais). Prieš darbą patirkinkite visus laidus ir jungtis. Atspurusius ir pažeistus laidus pakeiskite naujais.
2. Įsitikinkite, kad prieš elektroforezę maitinimo šaltinio miliampерmetras ir voltmetras nustatyti ties nulinėmis padalomis. Pradedant elektroforezę, nustatoma reikiama įtampa, srovės stiprumas ar elektrinio lauko galia. Baigus elektroforezę, maitinimo šaltinio miliampерmetras ir voltmetras vėl nustatomi ties nulinėmis padalomis ir tik tuomet jis išjungiamas ir nuimamas apsauginis elektroforezės aparato dangtelis. *Dėmesio! Niekada po elektroforezės neatjunkite aparato nuo maitinimo šaltinio prieš tai jo neišjungę, nes tuomet išjungtame maitinimo šaltinje ilgą laiką pasileka gana didelį kiekių elektros krūvių. Prisilietus prie tokio išjungto maitinimo šaltinio išėjimo lizdų galima gauti elektros smūgi.*

8.2. Omo dēsnis ir elektroforezē

Norint suprasti, kaip veikia gelelektroforezēs aparatas, reikia prisiminti Omo dēsnį: **ītampa (V) = srovės stiprumas (I) × varža (R)**, arba $V = IR$. Elektros grandinėje poliakrilamido gelį galima vertinti kaip tam tikrą varžą, o maitinimo šaltinių – kaip elektros srovės tiektuvą. Dauguma maitinimo šaltinių elektroforezēs metu gali palaikyti grandinėje arba pastovų elektros srovės stiprumą, arba ītampą. Kai kurie šaltiniai gali palaikyti pastovų elektrinio lauko galingumą: **galingumas = ītampa × srovės stiprumas**, arba $VI = I^2R$.

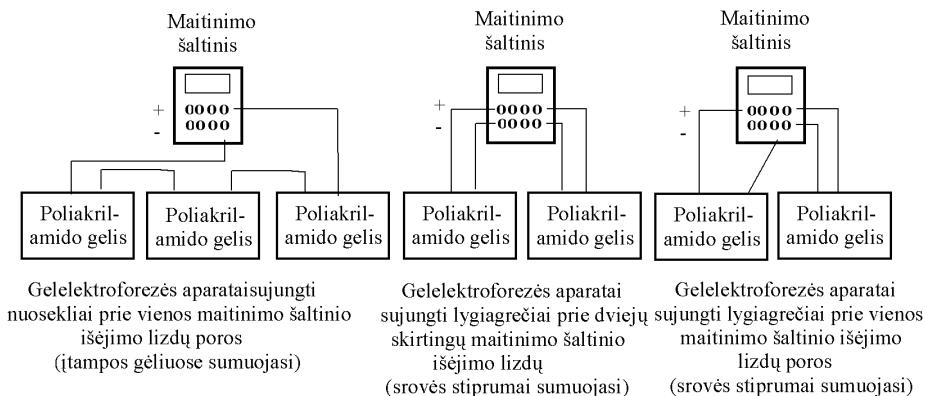
Vienkryptėje staciuje gelelektroforezēs sistemoje dažniausiai katodas dedamas viršutinėje elektrodinio buferio talpykloje, o anodas – apatinėje. Tai vadinamoji anijoninė sistema, kurioje neigiamai įkrautos balytymų ar nukleorūgščių molekulės juda anodo link, esančio apatinėje elektrodinio buferio talpykloje. Balytymų NDS-poliakrilamidinė gelelektroforezė (NDS-PAGE) yra anijoninė sistema, nes natrio dodecilsulfatas turi neigiamajį krūvį ir sudaro junginius su balytymais.

Kartais balytymų elektroforezė yra atliekama katijoninėje sistemoje. Šioje sistemoje balytymų molekulės įkrautas teigiamai. Tai pasiekiamas naudojant rūgštinius buferius (pvz. acto rūgšties/karbamido buferiai histonams atskirti) arba katijoninius ploviklius (pvz. cetiltrimetilamonio bromidas, CTAB). Katijoninės elektroforezēs sistemas elektrodų padėtis yra priešinga negu anijoninės sistemos.

Balytymų NDS-PAGE dažniausiai atliekama esant nekintamam elektros srovės stiprumui. Standartinėje Lemli sistemoje NDS-PAGE metu gelio varža didėja. Jeigu yra palaikomas nekintamas elektros srovės stiprumas, tuomet turi didėti ītampa.

Dažnai maitinimo šaltiniai turi daugiau negu vieną porą išėjimo lizdų. Šios lizdų poros lygiagrečiai sujungtos tarpusavyje. Jeigu daugiau negu vienas gelelektroforezēs aparatas yra tiesiogiai prijungtas prie šių lizdų, tai geliai yra sujungti lygiagrečiai (8.3 pav.). Tuomet ītampa kiekviename gelyje yra vienoda. Kitais žodžiais tariant, jeigu maitinimo šaltinyje yra nustatyta 100 V ītampa, tai ir kiekviename gelyje tarp elektrodų yra 100 V. Tačiau bendras elektros srovės stiprumas yra lygus sumai srovų stiprumų, esančių kiekviename gelyje.

Kelis gelelektroforezēs aparatus galima prijungti ir prie vienos maitinimo šaltinio išėjimo lizdų poros. Tuomet elektroforezēs aparatai yra sujungiami tarpusavyje. Tam tikrus gelius galima sujungti lygiagrečiai arba nuosekliai (8.3 pav.). Jeigu keli geliai yra prijungti prie tos pačios išėjimo lizdo poros nuosekliai, tai elektros srovės stiprumas kiekviename gelyje yra lygus bendram srovės stiprumui. Pavyzdžiu, jeigu maitinimo šaltinio miliampерmetras rodo 10 mA, tai kiekviename gelyje irgi teka 10 mA srovė. Tačiau šiuo atveju bendra ītampa yra lygi sumai ītampų, esančių kiekviename gelyje. Pavyzdžiu, jeigu esant pastoviam elektros srovės stiprumui 10 mA viename gelyje yra 100 V ītampa, tai du vienodi geliai, sujungti nuosekliai, sukels 200 V (100 V kiekvienas).



8.3 pav. Gelelectroforezės aparatu prijungimo prie maitinimo šaltinio būdai

Jeigu turime žemosios itampos maitinimo šaltinį, tai itampos dydis apibrėžia galimybę sujungti nuosekliai daugiau gelelectroforezės aparatų.

Poliakrilamido gelio storis taip pat turi reikšmės santykiai tarp elektros srovės stiprumo ir itampos. 1,5 mm storio gelį galima vertinti kaip du 0,75 mm storio gelius, sujungtus lygiagrečiai. Šiuo atveju srovės stiprumas sumuojas, todėl norint pasiekti tą pačią pradinę itampą ir elektroforezės laiką, 0,75 mm storio gelui reikės perpus mažesnio elektros srovės stiprumo negu 1,5 mm storio gelui. Jeigu gelio storis padvigubėja, tai ir srovės stiprumas turi būti padvigubintas. Elektroforezei storuose geliuose yra reikalingos didelės srovės. Dėl šios priežasties elektroforezės metu geliai kaista. Išskyrusi šiluma blogina baltymų elektroforezės skiriamąją galią. Tokie gelelectroforezės aparatai privalo turėti aušinimo sistemas.

8.3. Vienkryptė stačioji nutrūkstamoji baltymų gelelectroforezė denatūravimo sąlygomis (atsižvelgiant į Lemli)

Gelelectroforezės metu baltymų molekulių judėjimo greitis poliakrilamido gelyje priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo ir gelio porų dydžio (didinant akrilamido koncentraciją poros mažėja).

Dažniausiai nutrūkstamoji baltymų NDS-poliakrilamidinė gelelectroforezė yra atliekama taikant standartinę Lemli pasiūlytą metodiką. Yra ir kitų alternatyvių elektroforezės metodų, dažniausiai taikomų savitiems tikslams pasiekti (pvz., peptidams ar mažiem baltymams atskirti). Vienkryptėje gelelectroforezėje denatūravimo sąlygomis (esant 0,1 % natrio dodecilsulfato) baltymų molekulės elektriniame lauke poliakrilamido gelyje juda anodo link ir atskiria – tai priklauso nuo molekulinės jų masės (8.2 pav.). Nutrūkstamosios baltymų elektroforezės metu elektroforezės aparate

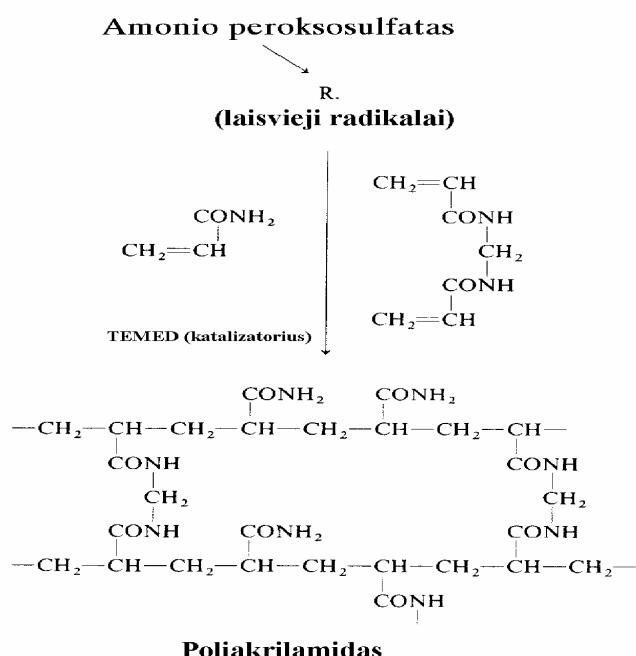
Yra paruošiamas skiriamasis poliakrilamido gelis, ant kurio viršaus polimerinamas koncentruojamasis poliakrilamido gelis, turintis šulinėlius pavyzdžiams įpilti. Prieš įpilant baltymus į šulinėlius, jie denatūruojami, pridėjus į mėginius natrio dodecilsulfato ir 2-merkaptoetanolio arba ditiotreitolio ir laikant verdančiame vandenye.

Stačioji baltymų elektroforezė yra atliekama tam tikro dydžio poliakrilamido gelio plokšteliėse. Dažniausiai jos būna apie 14×14 cm dydžio. Yra naudojamos ir mažesnės plokšteliės (6×8 cm). Tokie geliai vadinami minigeliais. Baltymų atskyrimo geba minigeliuose yra mažesnė negu didesniuose geliuose, tačiau elektroforezei reikia mažiau reagentų ir baltymus galima atskirti per trumpesnį laiką.

8.3.1. Poliakrilamido gelio paruošimas

Poliakrilamido gelis susidaro polimerizuojant akrilamidą. Linijinės poliakrilamido grandinės yra skersai sujungiamos N,N' -metilenbisakrilamidu. Polimerizacijos reakcija sukeliama amonio peroksosulfatu, o TEMED (tetrametiletilendiaminas) yra šios reakcijos katalizatorius (8.3 pav.).

Renkantis skiriamojo gelio akrilamido koncentraciją atsižvelgiama į atskirių baltymų molekulinių masių dydį. Rekomenduojamas 5 % gelis atskirti denatūruotus baltymus 60–200 kDa, 10 % gelis: 16–70 kDa ir 15 % gelis: 12–45 kDa (8.1 lentelė).



8.3 pav. Akrilamido ir N,N' -metilenbisakrilamido kopolimerizacijos reakcija

8.1 lentelė. Skiriamojo poliakrilamido gelio paruošimas ^a

Pradiniai tirpalai	Galutinė akrilamido koncentracija skiriamajame gelyje (%) ^b									
	5	6	7	7,5	8	9	10	12	13	15
30 % akrilamidas/0,8 % metilenbisakrilamidas	2,5	3,00	3,50	3,75	4,00	4,50	5,00	6,00	6,50	7,5
4× TRIS-HCl/NDS buferis pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
H ₂ O	8,75	8,25	7,75	7,50	7,25	6,75	6,25	5,25	4,75	3,75
10 % (svoris/tūris) amonio perokso sulfatas	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

^a 15 ml skiriamajam gelui paruošti (pakanka 0,75 mm × 14 cm × 14 cm gelio plokšteli).

^b Lentelėje nurodyti skaičiai reiškia atitinkamų tirpalų tūrius, išreikštus ml. Akrilamido koncentracija skiriamajame gelyje pasirenkama atsižvelgiant į atskiriamų baltymų molekulinių masių dydį.

Skiriamasis poliakrilamido gelis polimerinamas tarp stiklų elektroforezės aparato gardelėje. Polimerizacijos reakcija kambario temperatūros sąlygomis atliekama per 30–60 min. Ant susidariusio skiriamojo gelio viršaus polimerinamas stambiaporis (3–4 %) koncentruojamasis poliakrilamido gelis. Jame padaromi šulinėliai, baltymų pavyzdžiams įpilti. Paruošus skiriamąjį ir koncentruojamąjį gelius, stiklai su geliais įstatomi į elektroforezės aparą. Į viršutinę ir apatinę aparato talpyklas pripilama elektroforezės buferio. Buferis turi pripildyti koncentruojamajame gelyje esančius šulinėlius (viršutinėje talpykloje) ir skalauti skiriamojo gelio apačią (apatinėje talpykloje). Reikia įsitikinti, ar buferis neišteka iš viršutinės talpyklos.

8.3.2. Baltymų paruošimas elektroforezei ir jų įpilimas į koncentruojamojo gelio šulinėlius

Baltymai denatūruojami, pripilant natrio dodecilsulfato tirpalo ir 2-merkaptoetanolio ar ditiotreitolio. Mišins kaitinamas verdančio vandens vonioje. Jeigu po elektroforezės baltymai bus nustatomi dažant Coomassie mėliu, tai į 0,8 cm pločio šulinėlių rekomenduojama įpilti 25–50 µg baltymo < 20 µl tūryje (kai mišinyje yra daug skirtingų baltymų) ir 1–10 µg (kai mišinyje yra vienas arba keli skirtinių baltymų). Jeigu po elektroforezės bus dažoma sidabru, tuomet į šulinėlių reikia įpilti 10–100 kartų mažiau baltymo (0,01–5 µg < 20 µl tūryje, atsižvelgiant į baltymų mišinio sudėtį). Rekomenduojama, prieš pripilant denatūruojamujų agentų, baltymų tirpalus laikyti 0°C temperatūros sąlygomis ir denatūruojamujų agentų tirpalus (kambario temperatūros) pripilti į leduose esantį 1,5 ml plastikinį mègintuvėlį, turintį baltymų mišinio. Kad negaruotų, mègintuvėlių reikia dengti dangteliu, mišinį sumaišyti sūkurine

purtykle ir nedelsiant įdėti 3–5 min. į verdančio vandens vonią. Negalima kambario temperatūros sąlygomis ilgai laikyti balytmų kartu su denatūruojamaisiais agentais, nes prieš kaitinimą 100°C temperatūra, tokioje terpjėje ypač aktyvios endogeninės peptidazės, kurios gali suardyti mišinyje esančius tiriamus balytus. Be denatūruojamųjų agentų, tiriamų balytmų preparatuose dar yra glicerolio ~ 10 % (tūrio) ir bromfenolio mėlynojo.

Švirkštū, turinčiu tiesiai nupjautą adatą, į šulinėlius įpilami paruošti balytmų pavyzdžiai. Balytmų pavyzdžių tirpalai yra klampūs, todėl jie plonu sluoksniu užsluoksniuojami ant šulinelių dugno. Į nepanaudotus šulinėlius įpilama vien tik balytus denatūruojančio (pavyzdžio) buferio. Tai apsaugo nuo balytmų plitimo į aplinkinius tuščius (be balytmų) šulinėlius.

Į kontrolinius šulinėlius taip pat įpilama denatūruotų standartinių (žinomas molekulinės masės) balytmų mišinio (žr. Priedą). Jau paruoštus standartinių balytmų mišinius gamina komercinės firmos.

8.3.3. Elektroforezės aparato ijjungimas į elektros srovės šaltinį

Supylus į šulinėlius balytmų pavyzdžius, elektroforezės aparatas prijungiamas prie pastoviosios elektros srovės šaltinio 0,75 mm storio geliams nustatoma 10 mA stiprumo srovė. Kai bromfenolio mėlynojo dažas įeina į skiriamąjį gelį, srovės stiprumas padidinamas iki 15 mA. *Dėmesio! Standartiniame 16 cm ilgio ir 0,75 mm storio gelyje, esant 4 mA elektros srovės stiprumui, elektroforezė vyksta ~ 15 val. Jei srovės stiprumas 15 mA ~ 4–5 val. Vienu aparatu atliekant dviejų gelių elektroforezę, arba vieno 1,5 mm storio gelio, – srovės stiprumas padvigubinamas. Atliekant 1,5 mm gelio storio elektroforezę ir nustacių 30 mA srovės stiprumą, 10°–20°C temperatūra turi būti palaikoma termostatu, cirkuliujant pastoviosios temperatūros vandeniu. Esant didelei temperatūrai, gelyje judančios balytmų sritys išsiplečia ir išskraipo. Negalima atlikti elektroforezės, esant < 5°C temperatūrai, nes buferiniuose tirpaluose esantis natrio dodecilsulfatas iškrinta į nuosėdas.*

Kai judantis gelyje bromfenolio mėlynasis pasiekia skiriamojo gelio apačią, ijjungiamą elektros srovę ir elektroforezės aparatas ijjungiamas iš srovės šaltinio.

8.3.4. Elektroforezės aparato išrinkimas po elektroforezės

Iš viršutinės talpyklos išpilamas elektroforezės buferis ir iš aparato išimami stiklai, turintys gelius. Jie paddedami ant filtravimo popieriaus lapo arba popierinio rankšluosčio. Atsargiai pastumiamas į priekį viena tarpinė, esanti tarp stiklų, ir, naudojant ją kaip svertą, praskiriami stiklai. Nuimamas viršutinis stiklas ir nupjaunamas mažas gabalėlis gelio kampo tam, kad gelio dažymo metu galėtume žinoti takelių padėtį bei kas ir į kuriuos šulinėlius buvo įpilta.

8.3.5. Baltymų dažymas gelyje

Po elektroforezės baltymus gelyje galima nustatyti dažant juos Coomassie mėliu arba sidabru. Dažymas Coomassie mėliu yra paprastesnis ir greitesnis. Dažymo sidabru metodas yra jautresnis ir dažniausiai taikomas mažiem baltymų kiekiams nustatyti. Coomassie mėlis nesavitai jungiasi su baltymų molekulėmis. Šiuo dažu galima nudažyti 0,3 – 1,0 µg balytumo, esančio vienoje juostelėje. Baltymai gelyje yra tvirtinami izopropilo alkoholio ir acto rūgšties tirpalu ir nudažomi Coomassi mėliu. Išplovus dažą iš gelio, mėlynos nudažytos baltymų juostelės yra aiškiai matomos. Toks gelis gali būti laikomas acto rūgšties tirpale arba vandenye, fotografuojamas arba išdžiovinamas.

Dažant baltymus sidabru, prie tam tikrų balytumo molekulėje esančių cheminių grupių (sulfhidrilinių, karboksi-) prisijungia sidabras. Šiuo metodu galima nudažyti nuo 2–5 ng balytumo, esančio vienoje juostelėje. Baltymai poliakrilamido gelyje yra tvirtinami metanolio ir formaldehido tirpalu. Po gelio ekspozicijos sidabro nitrato tirpale, jis yra pamerkiamas į ryškalus. Ryškinimo metu pasiekus reikiama nudažytų baltymų juostelių ryškumą, gelis tvirtinamas. Jį galima fotografuoti, išdžiovinti.

8.4. Baltymų nustatymas gelio elektroforezės metodu

Prietaisai ir medžiagos

1. Elektroforezės aparatas, turintis spaustukus, stiklus, gelio paruošimo stovelij ir elektroforezės buferio talpyklas.
2. 0,75 mm storio tarpinės.
3. 0,75 mm storio politetrafluoretileno „šukos“, turinčios 1, 3, 5, 10, 15 arba 20 dantų.
4. Pastoviosios elektros srovės šaltinis.
5. 25 arba 100 µl švirkštas, turintis tiesiai nupjautą adatą.
6. 0,45 µm porų skersmens filtrai (naudojami pradiniams tirpalams ruošti).

Tirpalai ir jų ruošimas

1. **30 % akrilamido/0,8 % N,N'-metilenbisakrilamido tirpalas.** Ištirpinama 30 g akrilamido ir 0,8 g N,N'-metilenbisakrilamido ir pripilama H₂O iki 100 ml. Tirpalas perfiltruojamas pro 0,45 µm porų dydžio filtrą ir laikomas tamsoje, esant 4°C temperatūrai. Šis tirpalas sunaudojamas per 30 dienų, nes akrilamidas pamažu hidrolizuojasi iki akrilo rūgšties ir amoniako. *Dėmesio! Akrilamido monomeras yra neurotoksiškas. Sverti atsargiai. Dirbant su akrilamido tirpalais, mūvėti gumines pirštines ir nesiurbti burna pipetėmis šių tirpalų.*
2. **4×TRIS-HCl/NDS buferis pH 6,8 (0,5 M TRIS-HCl, 0,4 % NDS).** 6,05 g TRIS ištirpinama 40 ml H₂O. I gautą tirpalą įpilama 1 N HCl, kol tirpalo pH bus 6,8

ir pripilama H₂O iki 100 ml. Tirpalas perfiltruojamas pro 0,45 µm porų dydžio filtrą ir pridedama 0,4 g NDS. Laikoma, esant 4°C temperatūrai, iki 1 mėn.

3. **4x TRIS-HCl/NDS buferis pH 8,8 (1,5 M TRIS-HCl, 0,4 % NDS).** 91 g TRIS ištirpinama 300 ml H₂O. Iš gautą tirpalą pilama 1 N HCl, kol tirpalo pH bus 8,8 ir pripilama H₂O iki 500 ml. Tirpalas perfiltruojamas pro 0,45 µm porų dydžio filtrą ir pridedama 2 g NDS. Laikoma, esant 4°C temperatūrai, iki 1 mėn.
4. **1x TRIS-HCl/NDS buferis pH 8,8** (praskiedžiamas 4x TRIS-HCl/NDS buferis pH 8,8).
5. **2x balytymų denatūravimo (pavyzdžio) buferis** (25 ml 4 × TRIS-HCl/NDS buferio pH 6,8, 20 ml glicerolio, 4 g NDS, 2 ml 2-merkaptoetanolio arba 3,1 g ditiotreitolio, 1 mg bromfenolio mėlynojo ir pripilama H₂O iki 100 ml. Gerai išmaišoma ir, išpilsčius po 1 ml, laikoma, esant -70°C temperatūrai).
6. **10 % amonio peroksosulfato [(NH₄)₂S₂O₈] tirpalas** (svoris/tūris). Tirpalas ruošiamas prieš pat naudojimą.
7. **Tetrametiledilendiaminas (TEMED).**
8. **Elektroforezės buferis** (3,02 g TRIS, 14,4 g glicino, 1 g NDS ir pripilama H₂O iki 1000 ml. Laikoma, esant 0°–4°C temperatūrai, iki 1 mėn.).
9. **Standartinis mišinys balytymų, turinčių žinomas molekulines mases** (žr. Priedą).
10. **Tiriamų balytymų pavyzdžiai.**
11. **Izobutilo alkoholis, prisotintas vandens.**
12. **Balytymams dažyti Coomassie mėliu:**

Balytymų tvirtinimo tirpalas: [25 % (tūrio) izopropilo alkoholio, 10 % (tūrio) acto rūgšties ir 65 % vandens]. Laikoma kambario temperatūros sąlygomis.

Dažo Coomassie mėlio tirpalas: [10 % (tūrio) acto rūgšties, 0,006 % (svoris/tūris) Coomassie mėlio G-250, 90 % vandens]. Laikoma kambario temperatūros sąlygomis.

10 % (tūrio) acto rūgštis.

13. **Balytymams dažyti sidabru:**

Balytymų tvirtinimo tirpalas: [40 % (tūrio) metanolio, 0,5 ml 37 % formaldehido vienam litriui tirpalui, 60 % vandens]. Laikoma, esant kambario temperatūrai, iki 1 mėnesio.

Natrio tiosulfato (Na₂S₂O₃) tirpalas: 0,2 g/l.

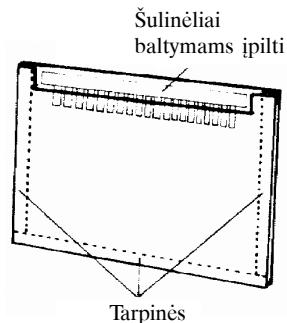
Ryškinimo tirpalas: [3 % (svoris/tūris) natrio karbonato, 0,0004 % (svoris/tūris) natrio tiosulfato, 0,5 ml 37 % formaldehido vienam litriui tirpalui (pripilama prieš pat naudojimą)]. Laikoma be formaldehido kambario temperatūros sąlygomis.

0,1 % sidabro nitrato tirpalas. Laikoma tamsiame butelyje kambario temperatūros sąlygomis iki 1 mėn.

2,3 M citrinų rūgštis tirpalas.

8.4.1. Skiriamojo gelio paruošimas

- Naudojant du švarius stiklus ir dvi tarpines surenkama elektroforezės aparato gardelė, skirta pripildyti skiriamojo ir koncentruojamojo poliakrilamidinių gelių (8.5 pav.). *Dėmesio! Stiklus galite nuplauti Alconox arba RBS-35 (Pierce) tirpalais.*
- Stiklai suspaudžiami spaustukais tarpusavyje. Gardelė įstatoma į pildymui skirtą stovejį.
- Į stiklinaitę supilami tirpalai, reikalingi skiriamam gelui paruošti (1 lentelė). Gerai išmaišoma.
- Paruoštu tirpalu pripildoma elektroforezės aparato gardelė. Tirpalas pilamas šalia tarpinės, esančios tarp stiklų. Nuo stiklų viršaus koncentruojamajam gelui paliekamas ~ 3 cm tarpas. *Dėmesio! Paruoštą tirpalą tarp stiklų reikia supilti nedelsiant, nes kitaip polimerizacijos reakcija įvyks pačioje kolbutėje.*
- Ant paviršiaus tirpalo, esančio tarp stiklų, pipete atsargiai užsluoksniuojama izobutilo alkoholio, prisotinto H_2O . Pilama palengva, iš pradžių šalia vienos, vėliau šalia kitos tarpinių, esančių tarp stiklų. *Dėmesio! Nesuardykite polimerinamo gelio paviršiaus.* Deguonis lėtina polimerizacijos reakciją, o izobutilo alkoholio sluoksnis neleidžia patekti deguoniui į polimerizacijos mišinį. Be to, gaunamas lygus ir plonščias poliakrilamido gelio paviršius.
- Laukiama, kol įvyks polimerizacijos reakcija (30–60 min. kambario temperatūros sąlygomis).



8.5 pav. Elektroforezės aparato gardelė

8.4.2. Koncentruojamojo gelio paruošimas

- Nupilamas izobutilo alkoholis, prisotintas H_2O , ir gelio paviršius kelis kartus praplaunamas $1 \times$ TRIS·Cl/NDS buferiu pH 8,8. *Dėmesio! Izobutilo alkoholio likučiai sumažina skiriamąjį elektroforezės gebą, todėl jis turi būti visiškai pašalintas. Izobutilo alkoholio sluoksnis ant gelio paviršiaus gali būti ne ilgiau kaip 2 valandas.*
- Į stiklinaitę pripilama 0,65 ml 30 % akrilamido/0,8 % N,N' -metilenbisakrilamido tirpalas, 1,25 ml $4 \times$ TRIS·HCl/NDS buferio pH 6,8 ir 3,05 ml H_2O . Pripilama 25 μ l 10 % amonio peroksosulfato tirpalas ir 5 μ l TEMED. Gerai išmaišoma.
- Gautas tirpalas supilamas tarp stiklų ant skiriamojo gelio. *Dėmesio! Paruoštą tirpalą tarp stiklų reikia supilti nedelsiant, nes kitaip polimerizacijos reakcija įvyks*

pačioje kolbutėje. Tarp stiklų įpiltame koncentruojamajame gelyje neturi būti oro burbulų. I užpiltą koncentruojamojo gelio sluoksnį įstatomos „šukos“ ir, jeigu reikia, papildomas koncentruojamojo gelio sluoksnis. Laukama, kol įvyks polimerizacijos reakcija (30 – 45 min. kambario temperatūros sąlygomis).

8.4.3. Baltymu preparatų paruošimas elektroforezei ir jų įpilimas į koncentruojamojo gelio šulinelius

1. 1,5 ml plastikiniame mēgintuvėlyje dalis tiriamo baltymu tirpalu praskiedžiamas santiukiui 1:1 su 2 × baltymus denatūruojančiu (pavyzdžio) buferiu ir 3 – 5 min. mišinys kaitinamas verdančio vandens vonioje. Rekomenduojami baltymu kiekiai nurodyti teorinėje šio aprašymo dalyje.
2. 1,5 ml plastikiniame mēgintuvėlyje paruošiamas reikiamu etaloniniu baltymu mišinys (žr. Priedą): jie ištirpinami 1 × baltymus denatūruojančiam (pavyzdžio) buferyje ir 3 – 5 min. kaitinama verdančio vandens vonioje. Rekomenduojami baltymu kiekiai nurodyti teorinėje šio aprašymo dalyje.
3. Atsargiai išimamos „šukos“.
4. Iš pripildymui skirto stovelio išimama gardelė ir įstatoma į elektroforezės aparatą. Į elektroforezės aparato talpyklas pripilama elektroforezės buferio.
5. Švirkštū, turinčiu tiesiai nupjautą adatą, į šulinelius įpilami paruošti baltymu pavyzdžiai, atsargiai, plonu sluoksniu jie sluoksniuojami ant šulinelių dugno. Į kontrolinį šulinelių įpilamas etaloniniu baltymu mišinys. Į nepanaudotus šulinelius įpilamas tokis pat tūris 1 × baltymus denatūruojančio (pavyzdžio) buferio.
6. Elektroforezės aparatas prijungiamas prie pastoviosios elektros srovės šaltinio ir atliekama elektroforezė (sąlygos nurodytos teorinėje šio darbo aprašymo dalyje).

8.4.4. Baltymu dažymas gelyje po elektroforezės

Dažymas Coomassie mėliu

1. Po elektroforezės poliakrilamido gelis įdedamas į plastikinę ar stiklinę vonelę ir užpilamas 3 – 5 gelio tūriais baltymu tvirtinimo tirpalu. Vonelė lėtai siūbuojama kambario temperatūros sąlygomis – 0,75 mm storio gelį – 10 – 15 min., 1,5 mm storio gelį – 30 – 60 min.
2. Išpilamas baltymu tvirtinimo tirpalas ir užpilama Coomassie mėlio dažo tirpalu. Vonelė lėtai siūbuojama kambario temperatūros sąlygomis, kol baltymu juostelės nusidažys norimo ryškumo mėlyna spalva (1 – 12 val.).
3. Dažų tirpalas išpilamas ir užpilama 10 % acto rūgštimi. Vonelė lėtai siūbuojama

kambario temperatūros sąlygomis, kol iš gelio išsiplaus dažas, nesusirišęs su baltymu (≥ 2 val.). Nuolatos pakeičiamas 10 % acto rūgšties tirpalas. Gelis laikomas 7 % acto rūgšties tirpale arba vandenye.

Dažmas sidabru

1. Po elektroforezės poliakrilamido gelis įdedamas į plastikinę vonelę ir pripilama 50 ml baltymų tvirtinimo tirpalui. Vonelė 10 min. lėtai siūbuojama kambario temperatūros sąlygomis. *Dėmesio! 10 min. laikas yra 0,75 mm \times 5,5 cm \times 8 cm dydžio ir 12,5 % koncentracijos poliakrilamido geliu. Gelis įdedamas į 8 \times 14 cm dydžio vonelę.*
2. Iš vonelės išpilamas baltymų tvirtinimo tirpalas ir gelis du kartus praplaunamas vandeniu. Visais atvejais 5 min. vonelė lėtai siūbuojama.
3. Išpilamas vanduo ir gelis pamerkiamas 1 min. į 50 ml natrio tiosulfato tirpalą. Vonelė lėtai siūbuojama.
4. Išpilamas natrio tiosulfato tirpalas ir gelis du kartus po 20 sekundžių praplaunamas vandeniu.
5. Išpilamas vanduo ir gelis 10 min. pamerkiamas į 50 ml 0,1 % sidabro nitrato tirpalą. Vonelė lėtai siūbuojama.
6. Išpilamas sidabro nitrato tirpalas ir gelis praplaunamas vandeniu bei mažu tūriu ryškinimo tirpalu.
7. Gelis pamerkiamas į 50 ml ryškinimo tirpalą ir vonelė lėtai siūbuojama, kol bus reikiamas baltymų juostelių spalvos ryškumas (~ 1 min.).
8. Norint sustabdyti ryškinimą, į vonelę įpilama 2,5 ml 2,3 M citrinų rūgšties tirpalas ir vonelė 10 min. lėtai siūbuojama.
9. Išpilamas tirpalas iš vonelės ir gelis užpilamas vandeniu. Gelis plaunamas 10 min. lėtai siūbuojant vonelę. Nudažytas gelis laikomas vandenye.

Pastabos

Baltymų elektroforezei reikia naudoti ypač švarius cheminius reagentus. *Jeigu poliakrilamido gelio paruošimo metu polimerizacijos reakcija vyksta lėtai*, tai tuomet reikia paruošti šviežią amonio peroksosulfato tirpalą, arba vienu trečdaliu padidinti jo koncentraciją, naudoti kokybišką TEMED.

Koncentruojamas gelis yra ruošiamas ir užpilamas prieš pat elektroforezę. Priešingu atveju, dėl difuzijos buferiai, esantys koncentruojamajame ir skiriamajame geliuose, susimaišys ir tai pablogins baltymų atskyrimą.

Elektroforezės metu tekant elektros srovei, gelis kaista. Nevienodas gelio šilimas turi įtakos baltymų judėjimo greičiui. Šoniniuose poliakrilamido gelio takeliuose baltymai juda lėčiau negu viduriniuose takeliuose (po elektroforezės nudažius baltymus gelis tarsi šypsosi). Tai galima pašalinti elektroforezės metu aušinant gelį arba mažinant elektros srovės stiprumą.

Neįprastas tam tikru balytymu molekulių judrumas poliakrilamido gelyje. Dažniausiai tokis neįprastas elektroforezinis judumas būdingas sudėtingiemis balytmams (glikoproteinams, nukleoproteinams, fosfoproteinams ir pan.) bei turintiems daug bazinių ir kitų įkrautų aminorūgščių liekanų.

Po elektroforezės nekokybiškos juostelės. Jei signalinio bromfenolio mėlynojo juostelė elektroforezės metu yra difuzinė, tuomet reikia paruošti naujus buferinius tirpalus ir monomero akrilamido tirpalą. Jeigu po elektroforezės nudažytose balytymuose juostelės yra difuzinės, tuomet rekomenduojama 25 – 50 % padidinti elektros srovės stiprumą bei naudoti didesnės koncentracijos skiriamajį gelį. Stebėti, ar nevyksta proteolizė, dėl kurios gali išnykti didelės molekulinės masės balytymuose juostelės ir susidaryti irimo produktą „šliūžės“ gelio takeliuose. Jeigu po elektroforezės balytymuose juostelių kraštai yra nelygūs ir dantytis, tuomet reikia sumažinti į šulinėlių pilamo balytymo kiekį arba 25 % sumažinti elektros srovės stiprumą. Kita priežastis tokiai dantytų balytymuose juostelių gali būti į šulinėlius įpiltos neištirpusių balytymų nuosėdos, kurias galima pašalinti centrifuguojant. Be to, kartais šiuos sunkumus galimą pašalinti sumažinus akrilamido koncentraciją gelyje. Dėl nekokybiško koncentruojamojo gelio (blogai įvykusi polimerizacijos reakcija), balytymuose juostelės turės nelygius dantytus kraštus. Tai gali būti ištaisoma nuorinant koncentruojamojo gelio polimerinimui paruoštą tirpalą arba vienu trečdaliu padidinant amonio peroksosulfato ir TEMED koncentracijas. Kita tokiai dantytų kraštų juostelių priežastis gali būti balytymuose pavyzdžiuose esančios druskos, todėl prieš elektroforezę patartina jas pašalinti dializuojant arba gelchromatografijos būdu. Jeigu paviršius tarp skiriamajo ir koncentruojamojo gelių yra nelygus, tuomet po elektroforezės susidaro kreivos balytymuose juostelės. Norint to išvengti, reikia, ruošiant skiriamajį gelį, labai atsargiai užpilti ant jo paviršiaus izobutilo alkoholio prisotintu H₂O. Kartais po elektroforezės matosi dvigubos balytymuose juostelės. Priežastis gali būti dalinė balytymu oksidacija arba irimas. Oksidaciją galima sumažinti, padidinant 2-merkaptoetanolio koncentraciją arba paruošiant balytymuose pavyzdžius prieš pat elektroforezę. Jeigu po elektroforezės susidaro mažiau juostelių negu tikimasi arba turėtų būti ir yra stebima plati balytymuose juosta signalinio dažo bromfenolio mėlynojo judėjimo zonoje, tuomet patariama padidinti akrilamido koncentraciją skiriamajame gelyje.

Didelę reikšmę balytymuose elektroforezės kokybei turi tiriamų balytymų preparatų paruošimas. Pagrindinis sunkumas yra balytymuose proteolizė endogeninėmis peptidazėmis, išskiriant juos iš lastelių bei ruošiant elektroforezei. Dauguma endogeninių peptidazių yra labai aktyvios buferiuose, turinčiuose natrio dodecilsulfato. Todėl patariama ruošiant balytymuose pavyzdžius elektroforezei, balytymuose denatūravimo (pavyzdžio) buferio pripilti ir 3 min. 70°–100°C temperatūros sąlygomis pakaitinti. Juos reikia pakaitinti prieš pat pavyzdžius pilant į poliakrilamido gelio šulinėlius. Kai kuriais atvejais, esant 100°C temperatūrai, gali susidaryti netirpios balytymuose sankaupos, kurios elektroforezės metu visiškai nejudą arba labai blogai juda gelyje. Todėl po elektroforezės nudažius balytymus Coomassie

meliu, poliakrilamido gelio pradžioje matomos tokų baltymų „šliūžės“. Norint išvengti proteolizės ir baltymų sankaupų, esant didelei temperatūrai, reikia baltymų išskyrimo metu naudoti savitusius peptidazių slopiklius ir/arba mažinti kaitinimo temperatūrą iki 70°–80°C.

Jeigu baltymai iš šulinelių greitai skverbiasi į koncentruojamajį gelį, tuomet reikia kiek galima sutrumpinti laiką tarp baltymų išplimo į šulinelius ir elektros srovės įjungimo, be to, padidinti koncentruojamajame gelyje akrilamido koncentraciją nuo 4 % iki 4,5 % ar 5 %. Norint išvengti baltymų difuzijos koncentruojamajame gelyje, patartina 25 % padidinti elektros srovės stiprumą.

Jeigu elektroforezė vyksta labai ilgai, priežastis gali būti didelė naudojamų buferių koncentracija arba mažas tekančios elektros srovės stiprumas.

Darbo trukmė

Skiriamojo ir koncentruojamojo poliakrilamido gelio paruošimas trunka apie 2–3 val. 14×14 cm dydžio, 0,75 mm storio gelyje elektroforezė vyksta 4–5 valandas, esant 15 mA (70–150 V) elektros srovės stiprumui, ir 3–4 valandas, jei elektros srovės stiprumas 20 mA (80–200 V). 1,5 mm storio gelyje elektroforezė vyksta 4–5 valandas, esant 30 mA elektros srovės stiprumui. 0,75 mm storio minigeliuose elektroforezė vyksta apie 1 valandą, esant 20 mA (100–120 V) elektros srovės stiprumui. Dažniausiai elektroforezė atliekama 15°–20°C temperatūros sąlygomis. Oru aušinamuose elektroforezės aparatuose rekomenduojama naudoti mažesnį elektros srovės stiprumą.

Literatūra

1. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, pp. 680–685.
2. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 2. 2000, J. Wiley & Sons, Inc.
3. Hames B. D., Rickwood D.(eds.). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, 2nd ed. 1990, Oxford University Press, (New York).
4. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). 1981, Наука, (Москва), 286 стр.

9. Nukleorūgščių gryninimas ir analizė

9.1. DNR gryninimas

Siekiant atlkti DNR analizę arba naudoti ją tolesnėms procedūroms, DNR turi būti išgryninta, be RNR ir balytymų priemaišų. Siekiant išgryminti nefragmentuotą ir mažiausiai mechaniskai paveiktą DNR taikomi patys švelniausi laštelių ardymo metodai. Idealiu atveju laštelių sienelės turėtų būti suardomos fermentiniu metodu (pvz., bakterijų apvalkalas – lizocimu), o laštelių membrana suardoma detergentais. Taikant fizinius laštelių ardymo metodus, reikia turėti omenyje, kad turėtų būti vengiama naudoti jégas, dėl kurių DNR molekulės gali trūkti. Laštelių suardymas ir visi kiti gryninimo etapai atliekami 4°C temperatūros sąlygr̄mis. Dažniausiai gryninimo metu naudojama EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis), surišanti Mg²⁺ jonus, kurie yra reikalingi fermentams deoksiribonukleazėms (DNazėms), aktyvinti. Gryninama steriliais tirpalais, neturinčiais DNazinio aktyvumo.

Suardžius lašteles, RNR priemaišos gali būti pašalinamos naudojant ribonukleazes (RNazes). Kartu išsiskyre balytmai pašalinami fenolinės ekstrakcijos metu – į mēginį įpilama fenolio ir chloroformo mišinio, kuris denatūruoja balytymus. Švelniai supurčius emulsija centrifuguojama. Dėl to emulsija pasiskirsto į dvi fazes: apatinę organinę ir viršutinę vandeninę, kurioje yra skiriamoji DNR. Tarp šių dvių fazų centrifugavimo metu nusistovi balta denatūruotų balytymų plėvelė. Viršutinė vandeninė fazė yra surenkama, jos fenolinį ekstrahavimą dažniausiai reikia kartoti 2–3 kartus, kol organinės ir vandeninės fazės sąlyčio paviršiuje nebepastebima denatūruotų balytymų plėvėlės.

Galiausiai, pašalinus balytymus, DNR išsodinama iš tirpalo etanoliu. Nuosėdos nucentrifugojamos ir išdžiovinus ištirpinamos buferyje, turinčiame EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) inaktyvina RNazes). DNR tirpalas gali būti laikomas esant +4°C temperatūrai mėnesį arba ilgiau užšaldžius (-20°C).

Išgryninant DNR iš tam tikrų organelių (pvz., mitochondrijų), rekomenduojama pirmiausia išgryninti organeles, o tik vėliau – DNR, nes išgryninti organelių DNR iš visos laštelių suminės DNR mišinio dažniausiai būna daug sudėtingiau. Ypatingai gryna DNR gaunama po centrifugavimo tirpale, turinčiame cezio chlorido gradientą.

Išgryninus DNR visada reikia patikrinti DNR vientisumą elektroforezės agaroziniame gelyje metu, ir nustatyti jos koncentraciją – pamatuoti DNR sugertį UV srityje, esant $\lambda=260$ nm. Tai yra daugiausia paplitęs DNR koncentracijos nustatymo metodas. Yra žinoma, kad įprastomis sąlygomis DNR tirpalo, kuriame dvigrandės DNR koncentracija yra 50 µg/ml, sugertis yra 1,0. Taigi, pamatavas nežinomas koncentracijos DNR tirpalo sugertį, galima nesunkiai paskaičiuoti, kokia yra DNR koncentracija tirpale.

Šis metodas turi ir daug trūkumų: pavieniai nukleotidai ir RNR priemašos taip pat sugeria UV ir tokiu būdu sustiprina signalą. Taikant šį metodą galima nustatyti tirpalų koncentraciją, kuriuose DNR yra ne mažiau kaip $2 \mu\text{g/ml}$.

Užrašant DNR sugerties spektrą UV srityje 200 – 300 nm galima ne tik nustatyti DNR koncentraciją, bet ir ištirti, ar preparate yra baltymų priemašų. Tam tikslui pamatuojama DNR tirpalio sugertis ties 280 nm, kurią lemia baltymai. Jeigu sugerties ties 260 nm santykis su sugertimi ties 280 nm yra daugiau kaip 1,8, laikoma, kad DNR tirpale nėra baltymų priemašų ($A_{260}/A_{280} > 1,8$).

9.2. RNR gryninimas

RNR gryninimo metodai yra labai panašūs į aukšciau aptartus DNR gryninimo metodus. RNR molekulės yra daug trumpesnės negu DNR, todėl jos nėra taip lengvai pažeidžiamos. Todėl gryninimo metu gali būti taikomi ir šiurkštesni ląstelių luardymo metodai. RNR yra labai pažeidžiama RNazių (ribonukleazių), kurių didelės koncentracijos yra ląstelėse, o taip pat egzogeninių – net ant žmogaus pirštų. Todėl RNR gryninimo metu būtina mūvėti gumines pirštines, o pradinėmis stadijomis naudoti stiprius detergentus – siekiant nedelsiant inaktyvinti RNazes. Vienas iš dažniausiai RNR gryninti naudojamų reagentų yra guanidino tiocianatas – veiksmingas RNazių slopiklis ir baltymų denatūrantas. RNR dažnai yra stipriai susijungusi su baltymais, todėl ypač svarbu kruopščiai pašalinti baltymus fenolinės ekstrakcijos metu (kaip aprašyta anksčiau, 9.1 sk.). DNR priemašos pašalinamos veikiant RNR mèginį DNazémis. RNR iš tirpalio išsodinama kaip ir DNR – etanoliu.

Kai kada būtina išgryninti eukariotinių ląstelių mRNR, kuri sudaro tik 2–5% suminės visos ląstelės RNR. Tokiu atveju reikia taikyti giminingumo chromatografijos metodą – oligo(dT)-celuliozės kolonėles. Esant didelei druskų koncentracijai, mRNR, turinti poliA sekas, jungiasi prie komplementarių oligo(dT) molekulių kolonėlėje, o kita ląstelių RNR (rRNR, tRNR) nesijungia ir pašalinama iš kolonos plaunant didelės koncentracijos druskų tirpalu. Galiausiai prijungtas mRNR molekules galima „atkabinti“ ir išsigryninti plaunant mažos koncentracijos druskų tirpalu.

Kaip ir DNR, išgryninus RNR visada reikia patikrinti jos vientisumą elektroforezės agaroziniame gelyje metu. Eukariotų ląstelėse daugiausia yra dviejų rūšių rRNR molekulių: t. y. 28S ir 18S rRNR, o prokariotų atitinkamai 23S ir 16S rRNR. Po elektroforezės agaroziniame gelyje identifikavus šias rRNR juostas galima tikėtis, kad ir kitos RNR molekulės (pvz., mRNR, tRNR) nebus pažeistos RNazių. Tačiau RNR elektroforezę patartina atliki denatūrujančiomis sąlygomis (formaldehidiniame agaroziniame gelyje) – tokiomis sąlygomis inaktyvinamas antrinių struktūrų susidarymas RNR molekulėse.

RNR koncentracija nustatoma matujant RNR tirpalio sugertį UV srityje, esant $\lambda=260 \text{ nm}$. Yra žinoma, kad išprastomis sąlygomis tirpalio, kuriame viengrandės RNR

koncentracija yra $40 \mu\text{g}/\text{ml}$, sugertis yra 1,0. Taigi, pamatavus nežinomos koncentracijos RNR tirpalo sugertij, galima nesunkiai suskaičiuoti, kokia yra RNR koncentracija tirpale. Užrašant RNR sugerties spektrą UV srityje ties 200 – 300 nm galima nustatyti, ar mėginyje yra baltymų priemaišų. Tam tikslui pamatuojama RNR tirpalo sugertis ties 280 nm, kurią lemia baltymai. Jeigu sugerties ties 260 nm santykis su sugertimi ties 280 nm yra daugiau kaip 1,8, laikoma, kad RNR tirpale nėra baltymų priemaišų ($A_{260}/A_{280} > 1,8$).

9.3. DNR modifikuojantys fermentai

9.3.1. Restrikcijos endonukleazės

DNR grandinės hidrolizė ir dviejų skirtingu DNR fragmentų sujungimas buvo pirmieji molekulinės biologijos metodai, atliliki laboratorijoje. Dabar jie yra visų rekombinantinės DNR darbų pagrindiniai etapai. Šiuo metu plačiai naudojamos įvairios restrikcijos endonukleazės – molekulinės žirklės, karpančios DNR molekules, DNR ligazės – sujungiančios DNR fragmentus ir kiti fermentai, modifikuojantys DNR.

DNR restrikcijos endonukleazės yra bakterijų fermentai. Jie prisijungia prie dvigrandės DNR molekulių ir „keliauja“ išilgai DNR grandinės, kol randa savitą DNR seką. Šioje srityje susidaro papildomi cheminiai ryšiai tarp baltymo ir DNR. Sąveika sustiprėja, pasikeičia fermento konformacija ir DNR grandinė hidrolizuojama deoksiriboziniame–fosfatiname karkase. Tai yra hidrolizuojamas kovalentinis ryšys tarp deoksirobozės ir fosfatinės grupės. Kiekvienas fermentas atpažįsta ir hidrolizuoją skirtinges DNR sekas (9.1 pav.). Tam tikri fermentai atpažįsta tik 4 bp ilgio DNR sekas, kiti – ilgesnes. Tačiau bendras restrikcijos endonukleazių atpažistamų sekų bruožas – sekos yra polindrominės. Tai yra skaitant jas 5'/?3' ir 3'/?5' kryptimi sekos yra vienodos.

<i>AluI</i>	5' ... A G C T ... 3'
buki galai	3' ... T C G A ... 5'
<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3'
buki galai	3' ... C C G G ... 5'
<i>BamHI</i>	5' ... G G A T C C ... 3'
lipnūs galai	3' ... C C T A G G ... 5'
<i>HindIII</i>	5' ... A A G C T T ... 3'
lipnūs galai	3' ... T T C G A A ... 5'
<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3'
lipnūs galai	3' ... C T T A A G ... 5'

9.1 pav. Tam tikrų DNR restrikcijos endonukleazių atpažistamos sekos ir kirpimo vietos. Dažniausiai fermentai pavadinami atsižvelgiant į šaltinio, iš kurio buvo išgrynti, pavadinimą. Pavyzdžiu, *EcoRI* buvo išgrynta iš *Escherichia coli* RY13, o *HindIII* iš *Haemophilus influenzae*.

Pirmaoji restrikcijos endonukleazė *Hind*II buvo išgryninta ir apibūdinta 1968 m. Nuo to laiko buvo išgryninta daugiau kaip 900 restrikcijos fermentų. Tam tikros restrikcijos endonukleazės kerpa simetriškai, ir palieka „bukus” galus (pvz., *Alu*I), o kitos, pvz., *Eco*RI – hidrolizuoją DNR grandinę ir palieka išsikišusius 5' arba 3' galus (9.1 pav.). Tokie DNR restrikcijos produktai vadinami „lipniais”.

9.1.2. DNR polimerazės

Visos DNR polimerazės katalizuoja reakciją, kurios metu prie DNR molekulės 3' galio hidroksiliekanos vienas po kito kovalentiskai prijungiami deoksiribonukleotidai. DNR molekulė sintezės metu ilgėja 5'→3' kryptimi. Reakcijai yra reikalingi keturi deoksiribonukleotidų trifosfatai (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Mg²⁺ jonai bei DNR matrica, pagal kurią yra kopijuojama nauja sintetinama DNR molekulė.

E. coli DNR polimerazė I – nuo DNR priklausoma DNR polimerazė, turinti 5'→3' polimerazinį ir 3'→5' bei 5'→3' egzonukleazinį aktyvumą. Išgryninta iš bakterijų praktiskai *E. coli* DNR polimerazė I buvo naudojama radioaktyviam DNR žymėjimui ir kDNR (kopijinės DNR) sintezei. Aktyvumo centrai, atsakingi už fermento polimerazinį ir egzonukleazinį aktyvumą, yra skirtinguose holofermento domenuose. Todėl apdorojus balytę peptidazėmis buvo galima gauti fermentą, neturintį vieno ar kito aktyvumo. Tad pamažu DNR polimerazę I pakeitė Klenovo fragmentas (angl. *Klenow*), kuris buvo gaunamas peptidaze subtilizinu apdorojus *E. coli* DNR polimerazę I. Tokiu būdu buvo pašalinamas DNR procedūroms nenaudingas 5'→3' egzonukleazinis aktyvumas. Praktiskai Klenovo fragmentas yra naudojamas žymint radioktyviaja žyme DNR molekules, pašalinant „lipnius“ 3' DNR galus, sintetinant dvigrandę DNR nuo viengrandės DNR. Įterpus mutacijas 3'→5' egzonukleaziniame Klenovo fragmento aktyvumo centre buvo gautas fermentas, turintis tik polimerazinį aktyvumą. Jis vadinamas exo-Klenovo fragmentu.

Bakteriofago T4 DNR polimerazė yra panaši į *E. coli* DNR polimerazę I. Ji turi 5'→3' polimerazinį ir 3'→5' egzonukleazinį aktyvumą. Tačiau fermentas neturi 5'→3' egzonukleazinio aktyvumo. T4 DNR polimerazė naudojama per tokius darbus, kaip ir Klenovo fragmentas, bet yra ir išskirtinių praktinių bruožų. T4 DNR polimerazės 3'→5' egzonukleazinis aktyvumas yra ~ 200 kartų didesnis nei Klenovo fragmento. Todėl šis fermentas daugiau tinkta darbams, kurių metu tenka pašalinti išsikišusius 3' „lipnius“ DNR galus.

Bakteriofago T7 DNR polimerazė taip pat turi 5'→3' polimerazinį ir 3'→5' egzonukleazinį aktyvumą, bet neturi 5'→3' egzonukleazinio aktyvumo. Šis fermentas yra labai procesyvus, lyginant su Klenovo fragmentu ar T4 DNR polimeraze. Tai yra fermentas susintetina daug ilgesnę DNR, kol disocijuoja nuo matricos. Todėl T7 DNR polimerazė buvo plačiai naudojama DNR sekai nustatyti Sengerio metodu. Fermento

$3' \rightarrow 5'$ egzonukleazinis aktyvumas buvo sloopintas chemiškai ar išterpiant mutacijas. Tokios fermento formos Sekvenazės pavadinimu šiandien plačiai naudojamos nustatant DNR seką.

Pastarajį dešimtmetį ypač dažnai naudojamos DNR polimerazės, išgrynintos iš termofilinių mikroorganizmų. *Taq* polimerazė iš *Thermus aquaticus* buvo išgryninta ir naudota anksčiausiai. Su jos naudojimu prasidėjo DNR dauginimo polimerazinės grandininės reakcijos metodu era (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Termofilinės polimerazės, kaip ir kitos polimerazės, turi $5' \rightarrow 3'$ polimerazinį aktyvumą, t. y. katalizuoja nukleotid trifosfatų prijungimą prie DNR pradmens $3'-OH$ grupės. Jų veiklos optimali temperatūra yra 75–80°C. Vėliau buvo išgrynintos ir naudoti pritaikytos ir kitos termofilinių bakterijų polimerazės: *Pfu*, Vent (arba *Tli*) (9.1 lentelė).

Viena iš svarbiausių termofilinių DNR polimerazių charakteristikų yra klaidų, įvykstančių DNR sintezės metu, dažnis. Nesunku nuspėti, kad polimerazėms, neturinčioms $3' \rightarrow 5'$ egzonukleazinio aktyvumo, būdingasi didesnis klaidų dažnis, nei polimerazėms, turinčiomis $3' \rightarrow 5'$ egzonukleazinį aktyvumą. *Taq* polimerazės klaidų dažnis yra didžiausias – $1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-5}$ klaidos/bp. ši *Taq* polimerazės savybė riboja jos naudojimą polimerazinei grandinėlei reakcijai, kai yra būtina išvengti klaidų, dėl kurių DNR sekoje gali atsirasti mutacijos. *Pfu* polimerazės yra tiksliausia – $1,5 \times 10^{-6}$ klaidos/bp.

Išskirtinių savybių turi revertazės, kurios funkcionuoja kaip nuo RNR priklausomos DNR polimerazės. Jų yra retrovirusuose (virusuose, kurių genome informacija yra koduojama RNR molekulėse). Infekcijos į šeimininko ląsteles metu šie fermentai sintetina kDNR molekules nuo viruso RNR genomo. Tokiu būdu viruso genomas, perkoduotas iš RNR į DNR, gali išterpti į šeimininko genomą. Laboratorijoje šis fermentas gali būti sėkmingai naudojamas DNR sintezei tiek nuo viengrandės RNR, tiek nuo viengrandės DNR matricos. Revertazėms būdingas ir RNazėsH aktyvumas, t. y. hidrolizuojamos RNR molekulės RNR-DNR hibridinėse molekulėse, kurios susidaro kDNR sintezės nuo RNR matricos metu. Visi retrovirusai turi revertazių, tačiau praktiškai dažniausiai naudojamos yra dvi: Moloney peliukų leukemijos viruso (angl.

9.1 lentelė. Termofilinės DNR polimerazės

Polimerazė	$3' \rightarrow 5'$ egzonukleazinis aktyvumas	Šaltinis ir savybės
<i>Taq</i>	nėra	<i>Thermus aquaticus</i> . Gyvavimo pusperiodis, esant 95 °C – 1,6 val.
<i>Pfu</i>	yra	<i>Pyrococcus furiosus</i> Mažiausias klaidų dažnis
Vent	yra	<i>Thermococcus litoralis</i> Gyvavimo pusperiodis esant 95 °C – 7 val.

Moloney murine leukemia virus) ir paukščių mieloblastozės viruso (angl. *Avian myeloblastosis virus*) revertazės. Pirmosios RNazinis aktyvumas yra daug silpnesnis nei paukščių mieloblastozės viruso revertazės, todėl ji tinkamesnė ilgujų kDNR molekulių sintezei.

9.1.3. Nukleazės

Nukleazės dažnai yra laikomos pikčiausiais tyrėjo, kuris stengiasi išsaugoti nepažeistus RNR ir DNR preparatus, priešais. Tačiau kartais deoksiribonukleazės (DNazės) ir ribonukleazės (RNazės) yra ir nepamainomi pagalbininkai molekulinių biologijos laboratorijose. Šiuo metu yra išgryninta ir apibūdinta tam tikrų nukleazių, kurios skiriasi savitumu substratui, reikalingais kofaktoriais, ir yra endonukleazės (hidrolizuojančios nukleorūgštis molekulės viduje) ar egzonukleazės (hidrolizuojančios nukleorūgštis nuo molekulės galų). Plačiausiai naudojamos DNazėI ir RNazėA, abi išgryntos iš jaučio kasos ląstelių.

DNazėI hidrolizuojančios viengrandę ir dvigrandę DNR. Tai yra endonukleazė, skelianti DNR pirimidinų (C ar T) susitelkimo vietose. Hidrolizės produktai yra 5' galuose fosforilinti monodeoksinukleotidai ir oligodeoksinukleotidai. Praktiškai DNazėI naudojama pašalinti DNR priemaišas iš RNR preparatų, per DNR – balytymų sąveikos tyrimus DNazėI pirštų atspaudų metodą (angl. *DNase footprinting*) ar padaryti DNR trūkius prieš pažymint ją radioaktyviaja žyme (angl. *radiolabeling by nick translation*).

RNazėA yra endoribonukleazė, hidrolizuojanti viengrandę RNR pirimidinų 3' galuose. Ji hidrolizuojant fosfodiesterinį ryšį tarp vieno nukleotido 5' –ribozės ir greta esančio pirimidininio nukleotido 3' –ribozės fosfatinės grupės. Hidrolizės produktai yra 3' galuose fosforilinti mononukleotidai ir oligonukleotidai. Dažniausiai RNazėA yra naudojama pašalinti RNR priemaišas iš DNR preparatų.

9.1.4. DNR ligazės

DNR ligazės katalizuoja fosfodiesterinio ryšio tarp vienos DNR molekulės 5' fosfato ir kitos (arba tos pačios) molekulės 3' hidroksiliekanos susidarymą. Šis fermentas naudojamas kovalentiskai sujungti dvi atskiras DNR molekules, dažniausiai įterpiant DNR fragmentą į plazmidinį klonavimo vektorių. Tai yra pagrindinis metodas kuriant rekombinantines DNR. Plačiausiai naudojama bakteriofago T4 DNR ligazė, kuriai reikalingas kofaktorius – ATP. *E. coli* DNR ligazė naudojama rečiau, o jos kofaktorius yra NAD.

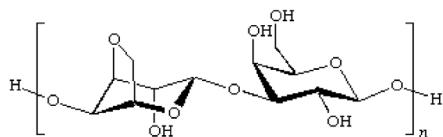
9.1.5. Fosfatazės ir kinazės

Plačiausiai naudojamos šarminės fosfatazės, kurių optimalus veikimo pH yra šarminis. Šie fermentai pašalina fosfatines grupes nuo DNR ir RNR 5' galų. Praktiškai naudojamos: bakterijų šarminė fosfatazė (angl. *bacterial alkaline phosphatase*, BAP), veršiuko žarnyno šarminė fosfatazė (angl. *calf intestinal alkaline phosphatase*, CIP) ir krevečių šarminė fosfatazė (angl. *shrimp alkaline phosphatase*). Šarminė bakterijų fosfatazė yra aktyviausias fermentas, tačiau reakcijos pabaigoje sunkiausia ją inaktivinti. Šarminė veršiuko žarnyno fosfatazė yra mažiau aktyvi nei bakterijų fosfatazė. Tačiau ji dažniau naudojama, nes pasibaigus reakcijai ją lengviau inaktivinti apdorojus reakcijos mišinį peptidazėmis ar pakaitinus aukštėsne (75°C) temperatūra. Fosfatazės praktiškai naudojamos klonavimo metu. Prieš įterpiant DNR fragmentą į plazmidinį klonavimo vektorių, vektoriaus 5' galų fosfatinės grupės yra pašalinamos defosforilinimo reakcijos metu. Tokiu būdu yra sumažinama paties vektoriaus DNR galų susijungimo galimybė ligazės katalizuojančios reakcijos metu, o padaugėja sujungtų vektoriaus ir įterpiamo DNR fragmento produktą. Šarminės fosfatazės plačiai naudojamos DNR 5' galų fosfatinėi grupei pašalinti prieš prijungiant 5' galuose radioaktyviaja žyme pažymėtą fosfatinę grupę.

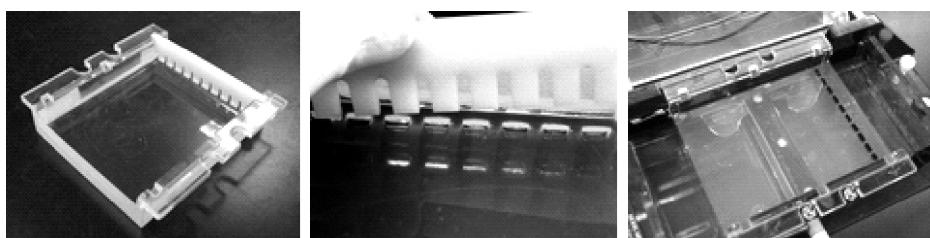
Fosfatinės grupės prijungimą prie DNR ir RNR 5' galio hidroksiliekanos katalizuoja kinazės. Praktiškai dažniausiai naudojama polinukleotidkinazė, išgrynta iš bakteriofago T4. Fosfatinė grupė yra pernešama nuo ATP molekulės. Tuo atveju, jeigu DNR ar RNR turi 5' galuose fosfatinės grupes, o reakcijos mišinyje yra ADP perteklius, polinukleotidkinazė pirmiausia gali pernešti fosfatus nuo nukleorūgščių ir prijungti prie ADP ($\text{P}+\text{ADP?ATP}$), o tada fosforilinti defosforilintus nukleorūgščių 5' galus. Tai yra mainų reakcija (angl. *exchange reaction*). Tačiau šios reakcijos metu fosforilinimo efektyvumas yra daug mažesnis. Praktiškai dažnai tenka fosforilinti DNR 5' galus naudojant polinukleotidkinazę. Pavyzdžiu, sintetinant 5' galuose radioaktyviaja fosfatine žyme pažymėtą DNR arba fosforilinti polimerazinės grandininės reakcijos metu padaugintus DNR fragmentus prieš įterpiant juos į plazmidinius ekspresijos vektorius klonavimo procedūrų metu.

9.4. Nukleorūgščių elektroforezė agaroziniame gelyje

Nukleorūgščių elektroforezės agaroziniame gelyje metu DNR ar RNR molekulės yra atskiriamos pagal dydį. Šis metodas gali būti tiek kickybinis, tiek kokybinis. Taikant modifikuotą elektroforezės metodą, vadinančią pulsuojančio lauko gelio elektroforeze (angl. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE), pagal dydį išskiriami dideli DNR fragmentai (pvz., chromosomos). Lengviausias ir daugiausia paplitęs metodas yra nukleo-elektroforezė horizontaliame agaroziniame gelyje.



9.2 pav. Agarozės struktūros vienetas – agarobiozé ($1\rightarrow 4$)-3,6-anhidro-a-L-galaktopiranozil-($1\rightarrow 3$)-b-D-galaktopirananas



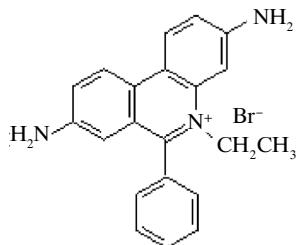
9.3 pav. Agarozinio gelio ruošimas ir elektroforezė. Išlydytas agarozės tirpalas supilamas į specialią formą, turinčią „šukutės“ (A). Sustingus „šukutės“ ištraukiamos (B). Jos suformuoja mėginių įpilimo šulinėlius. DNR mėginiai frakcionuojami elektros lauke (C)

Agarozė yra linijinis angliavandeniu polimeras (9.2 pav.), sudarytas iš D-galaktozės ir 3,6-anhidro-L-galaktozės, sujungtu β -($1\rightarrow 4$) glikozidiniu ryšiu ir gaunamas iš jūrų dumblių. Ruošiant gelį, buferinis agarozės tirpalas yra išlydomas ir supilamas į specialią formą (9.3 pav. A), leidžiama jam atvėsti ir sustingti (panašiai, kaip gaminama desertinė želė). Specialios „šukutės“, ištraukiamos geliuui sustingus (9.3 pav. B), suformuoja šulinėlius DNR mėginiams supilti. DNR mėginiai užnešami kartu su dažais bromfenolio mėlynuoju ir ksilencianoliu. Atsižvelgiant į juos stebima elektroforezės eiga, nes šie mėlynos ir violetinės spalvos dažai juda elektros lauke.

Idėjus agarozinį gelį, turintį įpiltus mėginius, elektros lauke (9.3 pav. C), nukleorūgštys, kurios yra neigiamai įkrautos, juda anodo link. Molekulių judėjimo greitis priklauso nuo kelių pagrindinių parametru:

- a) **nukleorūgščių molekulių dydžio.** Dvigrandės linijinės DNR molekulės juda gelyje greičiu, kuris yra atvirkščiai proporcingas jų molekulinių masės logaritmui. Tai yra kuo molekulė mažesnė, tuo greičiau ji juda gelyje;
- b) **agarozės koncentracijos.** To paties ilgio DNR fragmentas skirtinges koncentracijos geliuose juda skirtingu greičiu. Todėl didesnės koncentracijos agarozniai geliai yra naudojami trumpesniems, o mažesnės koncentracijos – ilgesniems DNR fragmentams frakcionuoti;
- c) **nukleorūgščių konformacijos.** Pavyzdžiu, to paties ilgio žiedinė, linijinė ir žiedinė, turinti viengrandį trūkį molekulę, juda skirtingu greičiu. Dažniausiai žiedinė DNR juda greičiau, nei tokio paties ilgio linijinė DNR;

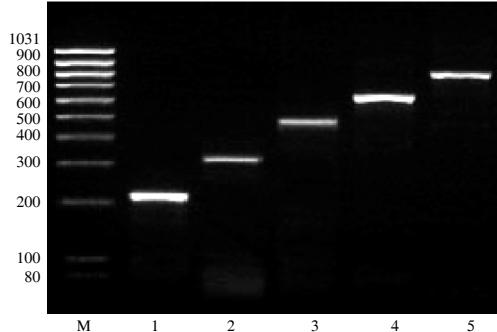
d) srovės stiprumo. Esant mažai įtampai, linijinės DNR judėjimas yra tiesiog proporcingas įtampai. Tačiau padidinus elektros lauko įtampą didelio molekulinių svorio DNR fragmentų judrumas pasikeičia skirtingai, todėl rekomenduojama elektroforezės įtampa yra 5 V/cm.



9.4 pav. Etidžio bromidas
(2,7-diamino-10-ethyl-9-fenilfenantrido bromidas)

Agaroziniuose geliuose elektroforezės metu frakcionuotos nukleorūgštys dažomos etidžio bromidu (9.4 pav.). Šis dažas jungiasi prie DNR ir RNR ir išterpia tarp heterociklinių bazių plokštumų (šis procesas vadinas interkaliaciją), o apšviestas UV fluorescuoja ryškiai oranžiškai rausva spalva. Taikant šį metodą, galima detektuoti ~1ng DNR.

Dažniausiai nukleorūgščių elektroforezės agaroziniame gelyje metodas yra taikomas DNR ar RNR vientisumui patikrinti, nagrinėti fermentinių reakcijų (pvz., restrikcijos endonukleazių, polimerazinės grandininės reakcijos) produktus. Agaroziniuose geliuose galima frakcionuoti didesnius kaip 100 bp DNR fragmentus (9.5 pav.). Trumpesnėms molekulėms atskirti tinkamesnis elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje metodas.



9.5 pav. DNR elektroforezės 2% agaroziniame gelyje vaizdas. M takelyje – DNR ilgio žymenys (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp). 1 takelyje – 212 bp, 2 – 329 bp, 3 – 446 bp, 4 – 622 bp, 5 – 802 bp ilgio DNR fragmentai.

9.5. Plazmidinės DNR gryninimas ir analizė

9.5.1. Plazmidinės pTZ19R DNR gryninimas

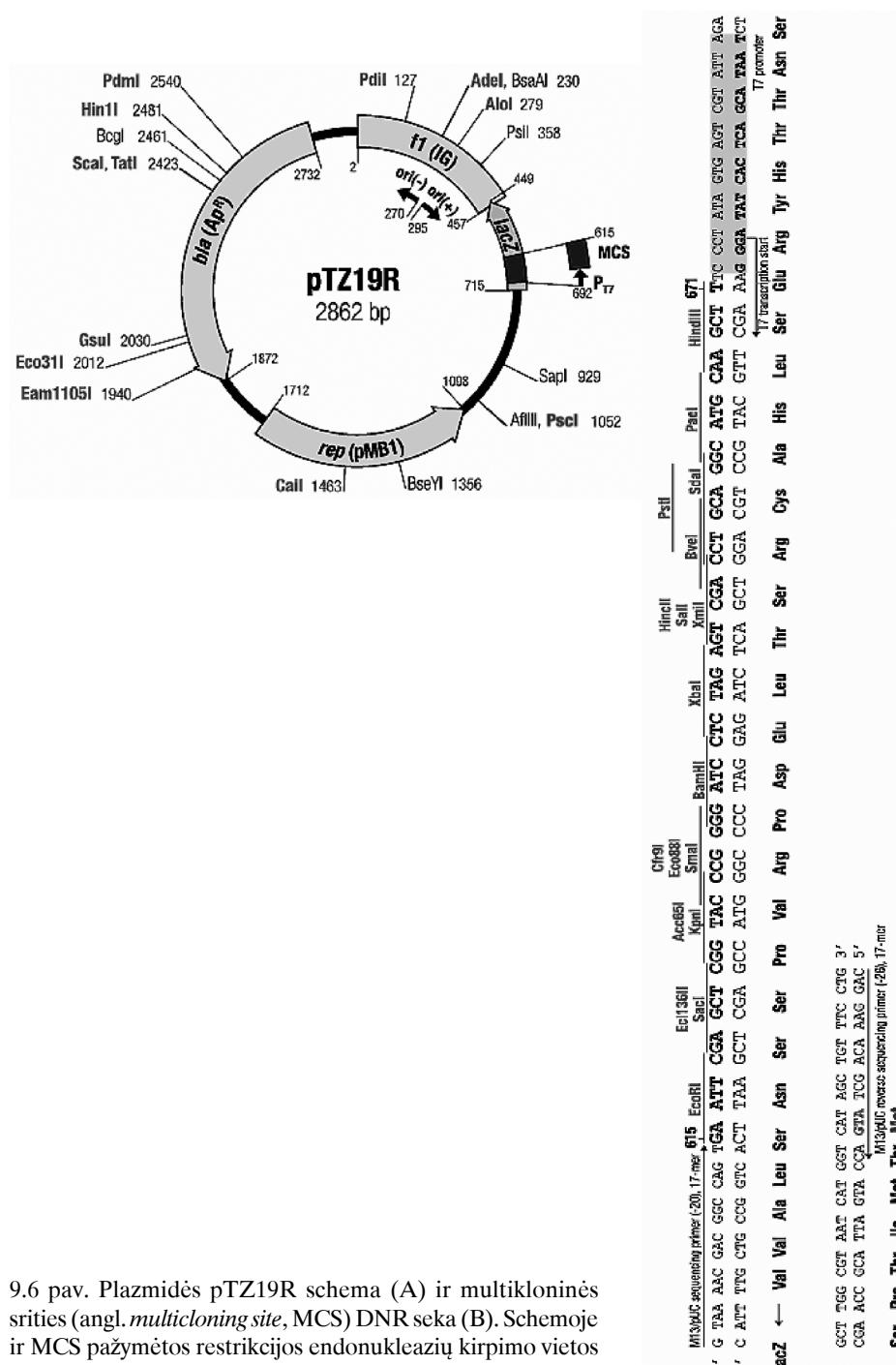
Medžiagos ir reagentai:

1. LB terpė (t. y. bakterijų auginimo terpė. Autorius – Luria-Bertani) turinti ampicilino (100 µg/ml).
2. STET buferis (8% sacharozė, 5% tritonas X-100, 50 mM EDTA, 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0).
3. 5 mg/ml lizocimo vandeninis tirpalas.
4. TE buferis (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
5. Izopropilo alkoholis.
6. 70% etanolis

Darbo eiga:

1. Bakterijų, turinčių plazmidę pTZ19R, kolonija suspenduojama 2 ml LB terpės, turinčios ampicilino (100 µg/ml), ir auginama esant 37°C temperatūrai 14–16 val.
2. 1,5 ml ląstelių kultūros supilama į mikrocentrifuginį mègintuvėlį ir centrifuguojamos 10 min. 7000 g. Ląstelės suspenduojamos 350 µl STET buferio, kuriame yra 30 µg/ml lizocimo.
3. Inkubuojama 5 min. kambario temperatūros sąlygomis.
4. Mèginys perkeliamas į verdančio vandens vonią ir inkubuojamas 40 sek.
5. Centrifuguojama 10 min. 10000 × g.
6. Po centrifugavimo mègintuvėlio dugne matyti ląstelių nuolaužų nuosėdos. Virš jų – 2 – 3 mm klampus polisacharidų sluoksnis. Tarp šio sluoksnio ir viršutinio vandeninio tirpalo, kuriame yra skiriamoji plazmidė, matoma skiriamoji faziu riba. Atsargiai nusiurbkite vandeninį viršutinį sluoksnį į švarų mikrocentrifuginį mègintuvėlį, neliesdami klampaus sluoksnio mègintuvėlio dugne.
7. Į supernatantą pripilama 350 µl TE buferio ir 800 µl izopropilo alkoholio. Sumaišoma purtykle ir inkubuojama kambario temperatūros sąlygomis 30 min.
8. Centrifuguojama 10 min. 10000 × g.
9. Supernatantas išpilamas, ant nuosėdų užpilama 100 µl 70% etanolio ir švelniai supurtoma.
10. Centrifuguojama 10 min. 10000 × g. Mègintuvėlio dugne matyti nedidelis kickis baltų plazmidinės DNR nuosėdų.
11. Supernatantas išpilamas, nuosėdos išdžiovinamos palikus atvirą mègintuvėlį kambario temperatūros sąlygomis keleta valandų ir ištirpinamos 50 µl TE buferio (pH 8,0).

9.5.2. Fermentinė pTZ19R DNR analizė



Medžiagos ir reagentai:

1. Restrikcijos endonukleazė EcoRI (10 u/μl).
2. DeoksiribonukleazėI (DNazėI 2 u/μl).
3. RibonukleazėA (RNazėA 10 mg/ml).
4. 10× reakcijos buferis (R+ buferis, AB „Fermentas“ (100 mM TRIS-HCl (pH 8,5), 100 mM MgCl₂, 1M KCl, 1 mg/ml BSA).
5. Sterilus H₂O

Darbo eiga:

Išgrynta pTZ19R DNR bus veikiama:

- a) restrikcijos endonukleaze EcoRI.
- b) deoksiribonukleazeI (DNazėI).
- c) ribonukleazeA (RNazėA).
- d) kontrolė – fermentais neveikta DNR.

1. Paruošiami fermentinių reakcijų mišiniai 4 mikrocentrifuginiuose mègintuveliuose. Pirmiausia iþpilama DNR tirpalo, vèliau sterilaus H₂O, paskui 10× reakcijos buferio, o galiausiai pripilama fermentu.

Reagentai	DNR veikiama			
	A su EcoRI	B su DNazėI	C su RNazėA	D kontrolė
Plazmidinės DNR tirpalas	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
Sterilus H ₂ O	7 μl	7 μl	7 μl	8 μl
10× reakcijos buferis	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
Fermentas	1 μl EcoRI	1 μl DNazėI	1 μl RNazėA	-
V _t - bendras reakcijos tûris	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl

Dèmesio – fermentų tirpalų nepalikite ant stalo kambario temperatûros sąlygomis, o panaudojë mègintuvèlius įstatykite atgal į ledus !

2. Reakcijos mišiniai inkubuojami 1 val., esant 37°C temperatûrai.

9.5.3. 1% agarozinio gelio paruošimas

Medžiagos ir reagentai:

1. Agarozè.
2. 10× TAE buferis (400 mM TRIS-acetato, 20 mM EDTA pH 8,0).
3. Etidžio bromido tirpalas (5 mg/ml).

Darbo eiga:

- Paruošiama 100 ml 1% agarozės tirpalas: 1g agarozės, 10 ml 10× TAE buferio, H₂O iki 100 ml.
- Tirpalas inkubuojamas mikrobangų krosnelėje arba verdančio vandens vonioje keletą minučių, kol pasidaro skaidrus (agarozė išsilydo).
- Leidžiama tirpalui atvėsti iki ~60°C temperatūros. Pripilama etidžio bromido iki galutinės koncentracijos 0,5 µg/ml, t. y. 10 µl ir gerai išmaišoma.
- Tirpalas supilamas į gelio formavimo sistemą (žr. 9.3 pav.).
- Po ~30 min. agarozė sukietėja. Išimamos šukutės ir gelis perkeliamas į elektroforezės aparatą ir užpilamas 1× TAE buferiu.

Dėmesio – etidžio bromidas yra mutagenas. Todėl mėgintuvėli, pripiltą tirpalą, ir agarozinį gelį lieskite tik mūvėdami gumines pirštines!

9.5.4. Fermentinių reakcijų produktų analizė agaroziniame gelyje.

Medžiagos ir reagentai:

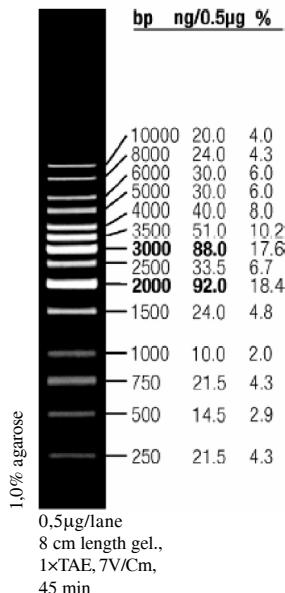
- 6×DNR mėginių buferis (10 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenolio mėlynojo, 0,03% ksilencianolio, 60% glicerolio, 60 mM EDTA).
- Reagentai elektroforezai – 1% agarozinis gelis, 1× TAE elektroforezės buferis.
- DNR ilgio žymenys (GeneRuler 1kb DNA Ladder, AB „Fermentas“).

Darbo eiga:

- Po inkubacijos reakcijos mišiniai paruošiami elektroforezei: į reakcijos mišinius pilama po 5 µl 6×DNR mėginių buferio.
- Po 10 µl paruoštų mišinių ir 10 µl DNR ilgio žymens pilama į agarozinio gelio šulinėlius.
- Atliekama DNR elektroforezė naudojant

1 šulinėlia	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis	5 šulinėlis
DNR ilgio žymenys	A	B	C	D

5 V/cm ~30–40 min. Jos eiga stebima atsižvelgiant į dažų, frakcionuojamų kartu su DNR mėginiais, judėjimą. Elektroforezė



9.7 pav. DNR ilgio žymenų (GeneRuler 1kb DNA Ladder, AB „Fermentas“) elektroforezės 1% agarozės gelyje vaizdas

atliekama, kol greičiau judantis dažas – bromfenolio mėlynasis „nucina“ du trečdalius gelio ilgio.

4. Pasibaigus elektroforezei gelis išimamas ir DNR analizuojama apšvetus UV.
Dėmesio – agaroziniame gelyje yra etidžio bromido, kuris yra mutagenas. Agarozinį gelį lieskite tik mūvėdami gumines pirštines!

9.6. Bakterijų RNR gryninimas ir analizė

9.6.1. Bakterijų RNR gryninimas

Medžiagos ir reagentai:

1. LB terpė (t.y. Luria-Bertani bakterijų auginimo terpė).
2. Tirpalas A (10 mM TRIS HCl pH 7.3, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂).
3. Tirpalas B (20 mM TRIS HCl pH 7.9, 0,2 M NaCl, 40 mM EDTA, 1% SDS).
4. Vandens prisotintas fenolis (pH 5.5).
5. Chloroformas.
6. Etanolis.
7. Sterilus H₂O (apdorotas DEPC- dietilpirokarbonatas inaktyvina RNazes).

Darbo eiga:

1. Bakterijų kolonija suspenduojama 20 ml LB terpės ir auginama esant 37°C temperatūrai 14 – 16 val.
2. Laštelės centrifuguojamos 10 min. 7000 × g ir suspenduojamos 1,5 ml šalto tirpalo A.
3. Priplama 1,5 ml tirpalo B.
4. 2 min. inkubuojama verdanėlio vandens vonioje. Atšaldoma leduose.
5. Į mèginį įpilamas lygus tūris (3,0 ml) vandens prisotinto karšto (65°C) fenolio. Supurtoma putykle.
6. Centrifuguojama 15 min. 10000 × g +4°C.
7. Viršutinė vandeninė fazė surenkama į švarų mègintuvėlį, stengiantis nepaliesti denatūruotų balytymų plévelės, susidariusios organinės (apatinės) ir vandeninės (viršutinės) fazų sąlyčio paviršiuje.
8. Viršutinės vandeninės fazės fenolinė ekstrakcija pakartojama antrą kartą (5 – 7 punktai).
9. Surinkus viršutinę vandeninę fazę po antrosios fenolinės ekstrakcijos, į mèginį įpilamas lygus tūris (3,0 ml) chloroformo.
10. Centrifuguojama 15 min. 10000 × g +4°C.
11. Viršutinė vandeninė fazė surenkama į švarų mègintuvėlį ir RNR išsodinama 2,5 tūriais etanolio.

12. Paliekama esant -20°C temperatūrai per naktį (galima ir ilgiau).
13. Centrifugojama 15 min. $10000 \times g$.
14. Supernatantas išpilamas, ant nuosėdų užpilama $100 \mu\text{l}$ 70% etanolio ir švelniai supurtona.
15. Centrifugojama 15 min. $10000 \times g$.
16. Supernatantas išpilamas, nuosėdos išdžiovinamos ir ištirpinamos $50 \mu\text{l}$ sterilaus H_2O (apdoroto DEPC).

9.6.2. Bakterinės RNR fermentinė analizė

Medžiagos ir reagentai:

1. DeoksiribonukleazėI (DNazėI $1 \text{ u}/\mu\text{l}$).
2. RibonukleazėA (RNazėA $10 \text{ mg}/\text{ml}$).
4. $10\times$ reakcijos buferis (R+ buferis, AB „Fermentas“ ($100 \text{ mM TRIS HCl (pH 8,5)}, 100 \text{ mM MgCl}_2, 1 \text{ M KCl}, 1 \text{ mg}/\text{ml BSA}$)).
5. Sterilus H_2O .

Darbo eiga:

Išgryninta bakterinė RNR bus veikiama:

- a) DeoksiribonukleazeI (DNazeI).
- b) RibonukleazeA (RNazeA).
- c) Kontrolė – fermentais neveikta DNR.

1. Paruošiami fermentinių reakcijų mišiniai 3 mikrocentrifuginiuose mēgintuveliuose. Pirmiausia išpilama RNR tirpalas, vėliau sterilaus H_2O , paskui $10\times$ reakcijos buferio, o galiausiai priplama fermentų.

Reagentai	RNR veikiama		
	A su DNazeI	B su RNazeA	C kontrolė
RNR tirpalas	10 μl	10 μl	10 μl
Sterilus H_2O	7 μl	7 μl	8 μl
$10\times$ reakcijos buferis	2 μl	2 μl	2 μl
Fermentas	1 μl DNazėI	1 μl RNazėA	-
V _t - bendras reakcijos tūris	20 μl	20 μl	20 μl

Dėmesio – fermentų tirpalų nepalikite ant stalo kambario temperatūros sąlygomis, o panaudojė įstatykite atgal į ledus !

2. Reakcijos mišiniai inkubuojami 1 val., esant 37°C temperatūrai.

9.6.3. Formaldehidinio 1,5% agarozės gelio paruošimas

Medžiagos ir reagentai:

1. Agarozė.
2. 10× elektroforezės MOPS/ EDTA buferis (0,2 M MOPS, 0,05 M CH₃COONa, 0,01 M EDTA pH 7,0).
3. 37% formaldehydo tirpalas.
4. Etidžio bromido tripalas (5mg/ml).

Darbo eiga:

1. Paruošiamą 100 ml 1,5% agarozės: 1,5 g agarozės, 10 ml MOPS/ EDTA 10× buferio, 87 ml H₂O.
2. Tirpalas inkubuojamas mikrobangų krosnelėje arba verdančio vandens vonioje keletą minučių, kol pasidaro slaidrus (agarozė išsilydo).
3. Leidžiama tirpalui atvėsti iki ~ 60°C temperatūros. Pripilama 5,1 ml 37% formaldehydo ir etidžio bromido iki galutinės koncentracijos 0,5 µg/ml, t.y. 10 µl.
4. Tirpalas gerai išmaišomas ir supilamas į gelio formavimo sistemą.
5. Po ~30 min. agarozė sukietėja. Išimamos šukutės ir gelis perkeliamas į elektroforezės aparątą ir užpilamas 1× MOPS/ EDTA buferiu.

Dėmesio – etidžio bromidas ir formaldehydas yra mutagenai. Todėl gelis ruošiamas traukos spintoje, o agarozinį gelį lieskite tik mūvėdami guminėmis pirštineis!

9.6.4. RNR analizė agaroziniame gelyje denatūravimo sąlygomis.

Medžiagos ir reagentai:

1. 6×RNR mėginių buferis, turintis dažų (1,5 ml: 0,75 ml dejonizuoto formamido, 0,15 ml 10× MOPS/EDTA buferio, 0,24 ml 37% formaldehydo, 0,1 ml glicerolio, 0,1 ml H₂O, 0,08 ml 10% bromfenolio mėlio vandeninio tirpalio ir 0,08 ml 10% ksilencianolio vandeninio tirpalio).
2. Reagentai elektroforezei: 1,5% agarozinis formaldehidinis gelis, 1× elektroforezės MOPS/ EDTA buferis.
3. DNR ilgio žymenys.

Darbo eiga:

1. Po inkubacijos reakcijos mišiniai paruošiami elektroforezei: į reakcijos mišinius pilama 5 µl 6×RNR mėginių buferio.
2. Mėginių 15 min. inkubuojami, esant 65°C temperatūrai ir atšaldomi lede.
3. Po 10 µl paruoštų mišinių ir 10 µl DNR ilgio žymens užnešama į agarozinio gelio šulinėlius.

1 šulinėlis	2 šulinėlis	3 šulinėlis	4 šulinėlis
DNR ilgio žymenys	A	B	C

4. Atliekama RNR elektroforezė naudojant 5 V/cm ~30–40 min. Jos eiga stebima atsižvelgiant į dažų, frakcionuojamą kartu su RNR mėginiais judėjimą. Elektroforezė atliekama, kol greičiau judantis dažas – bromfenolio mėlynasis „nueina“ du trečdalius gelio ilgio.
5. Pasibaigus elektroforezei gelis išsimamas ir RNR analizuojama apšvietus UV.
Dėmesio – agaroziniame gelyje yra etidžio bromido ir formaldehido, kurie yra mutagenai. Todėl elektroforezė atliekama traukos spintoje, o agarozinį gelį lieskite tik mūvėdami gumines pirštines!

9.7. Nukleoproteinų iš mielių išskyrimas ir analizė

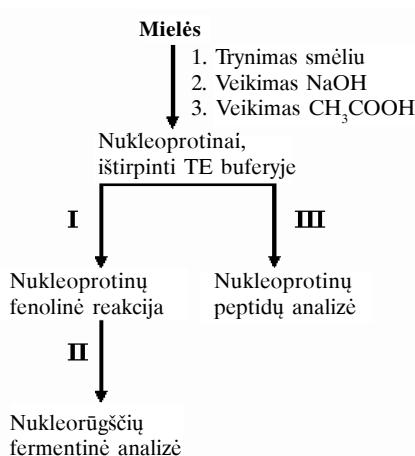
9.7.1. Nukleoproteinų išskyrimas.

Nukleoproteinai yra sudėtingi kompleksai sudaryti iš baltymų ir nukleorūgščių. Atsižvelgiant į nukleoproteino sudėtį įeinančios nukleorūgštis, yra ribo- ir deoksiribonukleoproteinai. Deoksiribonukleoproteinai dažniausiai yra laštelių branduolyje, įeina į chromatinio struktūrą. Ribonukleoproteinų daugiausia yra citozolyje. Ribosoma – geriausiai ištirtas ribonukleoproteinai.

Medžiagos:

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. Eteris. | 5. 0,4% NaOH. |
| 2. Sterilus H ₂ O. | 6. 10% H ₂ SO ₄ . |
| 3. Smėlis. | 7. TE buferis (10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). |
| 4. 5% CH ₃ COOH. | |

Darbo eiga:



9.8 pav. Nukleoproteinų išskyrimo ir analizės schema:

1. Į porceliano lēkštelię dedama 1 g džiovintų mielių, pilama 0,5 ml eterio, 0,5 ml sterilaus H₂O ir 0,5 g sterilaus smėlio. Mielės trinamos grūstuve 2–3 min.
2. Mikroskopu patikrinama, ar suardytos mielių laštelių sienelės.
3. Į lēkštelię pilama 4 ml 0,4% NaOH ir trinama dar 4–5 min.
4. Gautas mišinys perkeliamas į centrifuginij mėgintuvėli ir centrifuguojamas 10 min. 3000 × g.
5. Supernatantas perpilamas į švarų centrifuginij mėgintuvėli ir atsargiai maišant pilama 1,5 ml 5% CH₃COOH. Parūgštinus susidaro nukleoproteinų nuosėdos.
6. Nuosėdos atskiriamos centrifuguojant 10 min. 3000 × g.
7. Nukleoproteinų nuosėdos suspenduojamos 0,5 ml TE buferio. Suspensija padalijama po 250 ml į du mėgintuvėlius, iš kurių vienas bus skirtas nukleorūgštims, o kitas – peptidams nagrinėti.

9.7.2 Nukleoproteininio komplekso nukleorūgščių analizė.

Medžiagos:

1. SS fenolis, (angl. *salt saturated*). Druskų tirpalu prisotintas fenolis Chloroformo – fenolio mišinys (lygiomis tūrio dalimis).
2. Chloroformas.
3. 3M CH_3COONa pH 5,5.
4. Etanolis.
5. TE buferis (10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
6. 0,1M MgSO_4 .
7. DeoksiribonukleazėI (DNazėI 1 u/ μl).
8. RibonukleazėA (RNazėA 10mg/ml).
9. $6\times$ DNR mėginių buferis, turintis dažų (10mM TRIS HCl (pH 7,6) 0,03% bromfenolio mėlynasis, 0,03% ksilencianolio, 60% glicerolio, 60 mM EDTA).
10. Reagentai elektroforezei 1% agaroziniame gelyje (žr. 9.5.3 sk.).
11. DNR ilgio žymenys.

Darbo eiga:

- I. Atliekama nukleoproteinų fenolinė ekstrakcija, kurios metu pašalinami balymai.
1. I $250 \mu\text{l}$ nukleoproteino, suspenduoto TE buferyje, pripilamas lygus tūris ($250 \mu\text{l}$) SS- fenolio ir gerai supurtoma.
 2. Centrifugojama 5 min. kambario temperatūros sąlygomis $10000 \times g$.
 3. Viršutinė (vandeninė) fazė surenkama į švarų mègintuvėlį ir pripilama $250 \mu\text{l}$ fenolio –chloroformo (lygiomis tūrio dalimis) mišinio ir gerai supurtoma.
 2. Centrifugota 5 min. kambario temperatūros sąlygomis $10000 \times g$.
 3. Viršutinė (vandeninė) fazė surenkama į švarų mègintuvėlį ir pripilama $25 \mu\text{l}$ ($1/10$ tūrio) 3M CH_3COONa pH 5,5 ir 2 tūriai ($550 \mu\text{l}$) etanolio.
 4. Inkubuojama 2 val esant -20°C temperatūrai.
 5. Centrifugojama 15 min. $12000 \times g$ 4°C temperatūros sąlygomis.
 6. Supernatantas pašalinamas ir nuosèdos išdžiovinamos kambario temperatūros sąlygomis arba vakuminéje centrifugoje.
 7. Nuosèdos ištirpinamos $30 \mu\text{l}$ TE buferio.
 8. Pamatuojama gautos medžiagos sugertis UV srityje, esant bangos ilgiui 260 ir 280 nm. Aptyksliai paskaičiuojama nukleorūgščių koncentracija. Apskaičiuojams tūris, kuriame turètų būti 2–5 μg nukleorūgščių.
- II. Atliekama išskirtų nukleoproteinų nukleorūgščių fermentinė hidrolizė.

Nukleorūgštys bus veikiamos:

- a) deoksiribonukleazeI (DNazėI).
- b) ribonukleazeA (RNazėA).
- c) kontrolė – fermentais neveikta DNR.

- Paruošiami fermentinių reakcijų mišiniai 3 mikrocentrifuginiuose mègin-tuvéliuose. Pirmiausia iþilama nukleorùgščių tirpalo, véliau sterilaus H₂O, paskui 0,1M MgSO₄, o galiausiai pripilama fermentu.

Reagentai	Nukleorùgščys veikiamos		
	A su DNazeI	B su RNazeA	C kontrolė
Nukleorùgščių tirpalas 25 µg	X µl	X µl	X µl
Sterilus H ₂ O	Iki 20 µl	Iki 20 µl	Iki 20 µl
0,1 M MgSO ₄	1µl	1µl	1µl
Fermentas	2 µl DNazéI	2 µl RNazéA	–
V _t - bendras reakcijos tûris	20 µl	20 µl	20 µl

*Dëmesio – fermentų tirpalų nepalikite ant stalo kambario temperatûros sąlygomis,
o pasinaudojë įstatykite atgal į ledus !*

- Reakcijos mišiniai inkubuojami 1 val. 37°C temperatûros sąlygomis.

Fermentinës hidrolizës produktai analizuojami elektroforezës 1 % agarozës gelyje metodu. 1 % agarozës gelis paruošiamas kaip apraþyta anksčiau 9.5.3 sk.

- Po inkubacijos reakcijos mišiniai paruošiami elektroforezei: į reakcijos mišinius pilama 5 µl 6×DNR mèginių buferio.
- Po 10 µl paruoštų mišinių ir 10 µl DNR ilgio žymens užnešama į agarozinio gelio šulinélius.

Mèginių seka:

1 šulinèlis	2 šulinèlis	3 šulinèlis	4 šulinèlis
DNR ilgio žymenys	A	B	C

- Atliekama elektroforezë naudojant 5 V/cm ~30 – 40 min. Jos eiga stebima atsižvelgiant į dažų, frakcionuojamų kartu su DNR mèginiiais, judëjimą. Elektroforezë atliekama, kol greičiau judantis dažas – bromfenolio mëlynasis „nueina“ du trečdalius gelio ilgio.
 - Pasibaigus elektroforezei gelis iþimamas ir DNR analizuojama apþvietus UV.
- Dëmesio – agaroziniame gelyje yra etidžio bromido, kuris yra mutagenas. Agarozinių gelių lieskite tik mûvédami gumines pirštines!*

9.7.3. Nukleoproteinų komplekso peptidų analizė

Medžiagos:

1. Reagentai balytmų elektroforezei denatūravimo sąlygomis NDS (NDS – natrio dodecilsulfatas) poliakrilamidiniame gelyje (žr. laboratorinio darbo „Balytmų elektroforezė“ aprašymą).
2. Balytmų molekulinių masės žymenys.
3. $2\times$ balytmų mèginių buferis.

Darbo eiga:

III. Naudojant balytmų koncentracijos kalibracine kreive (Bredfordo metodas) apytiksliai ižvertinama išskirto nukleoproteinų tirpalo balytmų koncentracija (antrasis mèginiys, 9.7.1 sk).

1. Apskaičiuojama, kokiame nukleoproteinų tirpalo tūryje yra $100\text{ }\mu\text{g}$ ir $150\text{ }\mu\text{g}$ balytmų.
2. Paruošiami 3 mišiniai mikrocentrifuginiuose mègintuvèliuose balytmų elektroforezei:

1	2	3
Balytmų molekulinių masės žymenys 10 μl	$100\text{ }\mu\text{g}$ nukleoproteinų $X\text{ }\mu\text{l}$	$150\text{ }\mu\text{g}$ nukleoproteinų $Y\text{ }\mu\text{l}$
balytmų mèginių buferis 10 μl	balytmų mèginių buferis $X\text{ }\mu\text{l}$	balytmų mèginių buferis $Y\text{ }\mu\text{l}$

1 – balytmų molekulinių masės žymenys (kaip nurodyta lentelėje), 2 ir 3 – nukleoproteinų balymai. Pirmiausia įpilama nukleoproteinų tirpalo, kuriame yra $100\text{ }\mu\text{g}$ ir $150\text{ }\mu\text{g}$ balytmų, vèliau – lygus tūris $2\times$ balytmų mèginių buferio.

3. Mèginių denatūruojami verdančio vandens vonioje 4 min.
4. Atliekama balytmų elektroforezė denatūravimo sąlygomis NDS poliakrilamidiniame gelyje (žr. laboratorinio darbo „Balytmų elektroforezė“ aprašymą).

9.8. Chromosominės DNR išskyrimas iš eukariotinių ląstelių

Medžiagos:

1. Homogenizavimo buferis ($0,1\text{ M NaCl}$, $0,2\text{ M sacharozė}$, $0,01\text{ M EDTA}$, $0,3\text{M TRIS}$, pH 8,0). Laikyti esant 4°C temperatûrai.
2. 10% natrio dodecilsulfatas (NDS).
3. Chloroformas.
4. SS fenolis, (angl. *salt saturated*). Druskų tirpalu prisotintas fenolis.
5. 8 M kalio acetatas.
6. Etanolis.

Darbo eiga:

1. Į 10 ml polipropileninį mègintuvėli įdedama apie 100 mg audinio (pvz., žiurkės kepenų), iš kurio bus išskiriama DNR.
2. Pilama 2 ml homogenizavimo buferio.
3. Audiniai homogenizuojami tol, kol nelieka matomų kietų dalelių.
4. Pilama 125 μ l 10% natrio dodecilsulfato tirpalio ir sumaišoma purtant.
5. Inkubuojama vandens vonioje 30 min. 65°C temperatūros sąlygomis.
6. Pilama 350 μ l 8 M kalio acetato tirpalio ir sumaišoma purtant. Inkubuojama 60 min., esant 0°C temperatūrai.
7. Centrifuguojama 5000 \times g 10 min. 4°C temperatūros sąlygomis.
8. Supernatantas perpilamas į švarų 10 ml mègintuvėli. Nuosėdos pašalinamos.
9. Pilama 2 ml chloroformo ir 2 ml SS-fenolio. Sumaišoma atsargiai vartant mègintuvėli. Centrifuguojama 1500 \times g 10 min.
10. Viršutinė vandeninė fazė perpilama į švarų mègintuvėli. Apatinė organinė fazė pašalinama. Į vandeninę fazę pilama 2 ml chloroformo. Sumaišoma atsargiai vartant mègintuvėli.
11. Centrifuguojama 10000 \times g 15 min. Viršutinė vandeninė fazė perpilama į naują mègintuvėli. Apatinė chloroformo fazė pašalinama.
12. Į vandeninę fazę pilama 5 ml etanolio ir nusodinama DNR. Sumaišoma atsargiai vartant mègintuvėli. Centrifuguojama 1500 \times g 10 min.
13. Supernatantas pašalinamas ir ant nuosėdų pilama 5 ml 80% etanolio. Sumaišoma atsargiai vartant mègintuvėli.
14. Centrifuguojama 1500 \times g 5 min.
15. Etanolis pašalinamas ir nuosėdos išdžiovinamos kambario temperatūros sąlygomis, palikus atvirą mègintuvėli.
16. Nuosėdos ištirpinamos 300 μ l steriliaus TE buferio. DNR preparatas laikomas -20°C temperatūros sąlygomis.
17. DNR koncentracija nustatoma spektrofotometriiniu metodu – matuojama tirpalo sugertis ties 260 nm šviesos bangos ilgiu. Jeigu DNR tirpalio optinis tankis 1,0, tai dvigrandės DNR koncentracija yra 50 μ g/ml.
18. Ivertinamas DNR švarumas. Tam tikslui pamatuojama DNR tirpalo sugertis ties 280 nm, kurią lemia balytmai. Jeigu sugerties ties 260 nm santykis su sugertimi ties 280 nm yra daugiau negu 1,8, laikoma, kad DNR tirpale nėra balytų priemaišų. ($A_{260}/A_{280} > 1,8$).

Literatūra

1. Davis L.G., Dibner M.D., Battey J.F. 1986. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co. Inc.
2. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G. Smith J.A., strukhl K (eds.). 2000. Current protocols in Molecular Biology. J. Wiley & Sons Inc.

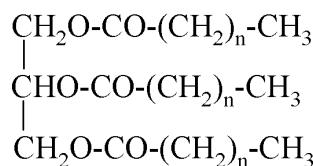
a. Triacilglicerolių hidrolizė

Lipidais vadinamos nepolinės medžiagos, kurios iš organizmų ekstrahuojamos organiniais tirpikliais pvz., chloroformu, etanoliu, eteriu, ir kurios blogai tirpsta vandenye. Tai yra didelė grupė medžiagų, kurios skiriasi struktūra, funkcijomis ir cheminėmis savybėmis. Riebalai, aliejai, vaškai, membranų lipidai, tam tikri vitaminai ir hormonai priklauso šiai margai junginių grupei.

Jie plačiai paplitę gyvajame pasaulyje ir atlieka tam tikras funkcijas. Riebalai daugiausia kaupiasi riebalinėse ląstelėse, riebalų ląšelių forma. Jie yra organizmo energijos šaltinis. Fosfolipidai, susijungę su balytmais sudaro membranas, kurios apgaubia ląstelę ir organeles. Riebalai apsaugo organizmą nuo termininio ir fizikinio poveikio. Augaluose vaškai sudaro papildomą apsauginį sluoksnį. Bitės iš vaško gamina kurius. Lipidams priklauso cholesterolis, kuris labai svarbus membranų struktūrai palaikyti, iš jo sintetinamas vitamina D, tulžies rūgštys, lytiniai hormonai (estrogenas, testosteronas) ir adrenokortikotropiniai hormonai. Terpenai, pvz., karotinoidai, reikalingi fotosintezės, regėjimo procesams. Augalų eterinių aliejų kvapą lemia terpenai.

Vieni iš lipidų atstovų yra acilglicerolai, kurie yra glicerolio ir riebalų rūgščių esteriai. Vaškai yra aukštesniųjų alkoholių ir riebalų rūgščių esteriai. Glicerofosfolipidai sudaryti iš glicerolio, riebalų rūgščių ir fosfato rūgštys, prie kurios gali būti prijungtas pakaitas – cholinas, serinas, 2-aminoetanolis, ar kiti alkoholiai. Jeigu alkoholis yra ne glicerolis, o aminoalkoholis sfingozinas, susidaro sfingolipidai. Sfingolipidams priklauso sfingomielinai, cerebrozidai, gangliozidai. Sfingomielinai sudaryti iš sfingozino, riebalų rūgščių, fosfato rūgštys ir dažniausiai cholino. I cerebrozidų sudėtį įeina sfingozinas, riebalų rūgštys ir monosacharidai. Gangliozidai susidaro susijungus sfingozinui, riebalų rūgštims ir oligosacharidu. Prie pastarojo prisijungusi sialo rūgštis suteikia gangliozidui neigiamą krūvi. Lipidai, i kurių sudėtį įeina fosforo rūgštis yra vadinami fosfolipidais, o turintys angliavandeniu – glikolipidais.

Acilglicerolai, – nepolinės, hidrofobinės, vandenye netirpios medžiagos – dar vadinamos triglyceridais, riebalais arba neutralaisiais riebalais. Jie yra glicerolio ir riebalų rūgščių esteriai.



Prie glicerolio gali būti prijungusios 1, 2 ir 3 riebalų rūgščių liekanos , taigi sintetinami mono-, di- ir triacilglicerolai.

I triacilglicerolių sudėtį įeinančios riebalų rūgštys gali būti vienodos, pavyzdžiui tristearino ar trioleino rūgštys. Gamtoje dažniausiai būna skirtingo ilgio ir sotumo

laipsnio riebalų rūgštys. Svieste yra daug palmitino rūgštis, pagrindinę sėmenų aliejaus dalį sudaro linoleno rūgštis. Triacilglicerolių lydymosi temperatūra priklauso nuo nesočiujų riebalų rūgščių buvimo. Augalose vyrauja nesočiosios riebalų rūgštys, todėl iš jų gauti triacilgliceroliai kambario temperatūros sąlygomis yra skysti ir vadinami aliejais.

Triacilgliceroliai yra veiksminga energijos saugojimo forma. Jų dėka, organizmui badaujant, galima apsirūpinti energija 2–3 mėnesiams. Glikogeno atsargų užtenka tiktais vienai parai.

Vaškai yra esteriai, sudaryti iš ilgujų anglies grandinių ($C_{16} - C_{30}$) alkoholių ir riebalų rūgščių ($C_{14} - C_{36}$). I vaškų sudėtį įeina cetilo (C_{16}), cerilo (C_{26}), miricilo (C_{30}) ir kiti alkoholiai bei sočiosios ar nesočiosios, didelio lyginio anglies atomų skaičiaus monokarboksirūgštys.

Bendra vaškų formulė: $CH_3-(CH_2)_n-O-CO-(CH_2)_n-CH_3$

Vaškus išskiria augalai ir gyvūnai. Vaškų funkcija yra sudaryti apsaugines dangas. Paukščių plunksnos ir gyvulių kailis turi vaškinį apdangalą, kuris apsaugo nuo sušlapimo. Vaškinė lapų ir vaisių danga mažina vandens nuostolius, apsaugo nuo infekcijos.

Pagrindinis bičių vaško sandas yra miricilpalmitatas, $CH_3-(CH_2)_{29}-O-CO-(CH_2)_{14}-CH_3$.

Riebalų rūgštys Daugumos lipidų sudėtyje randamos riebalų rūgštys. Riebalų rūgštys yra ilgos anglavandeninės grandinės monokarboksirūgštys. Gamtoje aptinkama apie 100 riebalų rūgščių, turinčių 4–36 anglies atomus, jos retai būna laisvos, dažniausiai yra esterifikuotos.

Bendra riebalų rūgščių formulė yra ši:



Gamtoje dažniausiai sutinkamos riebalų rūgštys, kurių molekulės yra nešakotos ir turi lyginį anglies atomų skaičių. Riebalų rūgštys gali būti sočiosios ir nesočiosios. Gali būti vienas ar keli dvigubieji ryšiai. Labai svarbios organizmo vystymuisi yra polinesočiosios riebalų rūgštys (PUFA). Nesočiosiose riebalų rūgštyste dvigubieji ryšiai nesudaro konjuguotos sistemos. Jie yra atskirti metileno ($-CH_2-$) grupe $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$. Be to, nesočiosios riebalų rūgštys yra cis konfiguracijos. Dvigubojo ryšio padėtis žymima simboliu Δ , skaičiais pažymima tarp kurių C atomų šis ryšys susidaro. Pavyzdžiui, C18:1 Δ^9 reiškia, kad riebalų rūgštis sudaryta iš 18 anglies atomų, turi vieną dvigubajį ryšį, kuris yra tarp 9 ir 10 anglies atomų. Kartais vartojama alternatyvi terminologija: omega (ω).

Nefermentinė triacilglicerolių (riebalų) hidrolizė vyksta veikiant riebalus rūgštimis, šarmaiš ir perkaitintais vandens garais. Hidrolizuojant riebalus, susidaro glicerolis ir

riebalų rūgštys. Veikiant šarais, gaunamos riebalų rūgščių druskos. Riebalų rūgštys netirpsta vandenye. Jų ir šarminių metalų druskos - tirpieji muilai. Riebalų rūgščių žemės šarminių ir sunkiuju metalų druskos vandenye netirpsta. Tirpieji muilai - paviršinio aktyvumo medžiagos.

Darbo metu hidrolizuojami riebalai, esant spiritiniams kalio hidroksido tirpalui. Susidarančios kalio muilai gerai tirpsta vandenye. Parūgštinus jų tirpalą susidaro netirpios riebalų rūgštys.

Reagentai

1. Riebalai, 0,5 g.
2. Spiritinis kalio šarmo tirpalas (5 g kalio hidroksido šildant ištirpinami 10 ml vandens ir įpilami į 100 ml etanolio).
3. 10% druskos rūgštis, 50 ml.
4. Eteris, 20 ml.
5. Etanolis, kuriame yra 1 ml 10% natrio karbonato tirpalas ir 0,2 ml spiritinio fenolftaleino tirpalas, 50 ml.
6. 0,2 M CuSO₄, 10ml.

Darbo eiga

a) riebalų hidrolizė

1. 0,5 g riebalų dedama į mègintuvėlį ir įpilama 5 ml spiritinio kalio hidroksido tirpalas. Mègintuvėlis užkemšamas kamščiu su įstatytu vamzdeliu (grìžtamasis šaldytuvas).
2. Hidrolizuojama verdančio vandens vonioje 30 min.
3. Hidrolizei pasibaigus, skystis perpilamas į porceliano lèkstelę, įpilama 10 ml vandens ir šildoma ant verdančio vandens vonios, kad išgaruotų spiritas.

b) glicerolio nustatymas riebalų hidrolizés produktuose

1. Į mègintuvėlį, kuriame yra 1 ml po riebalų hidrolizés gauto vandeninio tirpalas (**a** bandymas), įpilama 0,1ml 0,2 M CuSO₄ tirpalas ir supurtoma.

c) riebalų rūgščių išskyrimas

1. Į gautą porceliano lèkstelę tirpalą (**a** bandymas) pilama 10% HCl, kol nustos susidaryti nuosèdos. Pilant HCl, skystis maišomas lazdele.
2. Riebalų rūgščių nuosèdos filtruojamos ir plaunamos ant filtro distiliuotu vandeniu, kad pasišalintų HCl. Filtratas neturi sukelti rūgščios reakcijos (nustatoma naudojant universalaus indikatoriaus popieriuk¹).
3. Riebalų rūgščių nuosèdos ištirpinamos 1ml eterio, vèliau pilama 1ml etanolio, kuriame yra natrio karbonato tirpalas ir fenolftaleino. Rausva etanolio spalva išnyksta.

Kontroliniai klausimai:

1. Iš ko sudaryti glicerofosfolipidai?
2. Iš ko sudaryti sfingolipidai, cerebrozidai, gangliozidai?
3. Parašykite triacilglicerolių, diacilglicerolių ir monoacilglicerolių formules.
4. Dėl kieno poveikio hidrolizuojami riebalai?
5. Kodėl išnyksta rausva etanolio spalva, įpylus riebalų rūgščių eterinio tirpalo?

10. Pradinio fermentinės reakcijos greičio nustatymas

10.1. Fermentai – biologiniai katalizatoriai

Gyvuose organizmuose cheminės reakcijos vyksta labai greitai, nes jas katalizuoją baltymai, vadinami fermentais.

Fermentų katalizuojamos reakcijos – tai procesai, kurių metu kataliziškai aktyvūs baltymai (fermentai) katalizuoja substratų virtimą reakcijos produktais.

Fermentų savybės

Fermentai yra **saviti** savo substratams, jie **efektyviai veikia** (t. y. pakanka labai mažą jų koncentraciją) **švelniomis sąlygomis** (atmosferos slėgyje, reakcijos terpės pH neutralus, temperatūra nedidelė). Katalizuodami reakcijas **fermentai nesusinaudoja** ir dėl reakcijos **nepakinta**. Jie **nepakeičia reakcijos pusiausvyros** (katalizuoja ir tiesioginę ir atvirkštinę reakcijas), bet $10^{10} - 10^{16}$ kartų **padidina reakcijos pusiausvyros pasiekimo greitį** (palyginant su reakcijomis, vykstančiomis be katalizatoriaus).

Atsižvelgiant į šių fermentų savybes, **fermentų veikla yra reguliuojama** (fermentų aktyvumas didinamas arba mažinamas). Fermentų aktyvumas reguliuojamas prijungiant tam tikrus reguliacinius baltymus, aktyviaklius ar slopiklius (inhibitorius), alosterinius elektorius ir panašiai.

Paprasciausia fermentinė reakcija reaguojant vienam substratui aprašoma lygtimi:



Substrato (S) molekulė reaguoja su fermentu (E), susidaro fermento ir substrato (ES) kompleksas, kuris virsta produktu (P).

10.2. Katalizės samprata

Tarp sistemoje esančių medžiagų įvyksta cheminė reakcija, jei šių medžiagų molekulės yra sužadinamos ir aktyvinamos. Energija reikalinga tam, kad molekulės pereitų iš pereinamają būseną ir galėtų saveikauti, vadinama **aktyvacijos energija E_A** .

E_A – energijos kiekis, būtinas, kad visos 1 molio medžiagos molekulės, esant tam tikrai temperatūrai, pasiektų pereinamają būseną.

Reakcijos greitis yra proporciniškas molekulių, pasiekusių pereinamąjį būseną, koncentracijai. Reakcijos greitį galima padidinti dvemis būdais:

1. Didinant temperatūrą – suteikti papildomos energijos (t. y. didinti šiluminį molekulių judėjimą, kartu – vidinę jų energiją). Padidinus temperatūrą 10°C reakcijos greitis padidėja apytikriai 2–3 kartus. Biologinėms sistemoms šis būdas nėra veiksmingas, nes temperatūros didinimo ribos yra gana mažos. Fermentai yra baltymai, daugumos jų denatūracija prasideda, esant $\sim 60^{\circ}\text{C}$ temperatūrai.
2. Mažinant aktyvacijos energiją.

Reagujant substratui su fermentu, tarpinio fermento ir substrato kompleksu (ES) susidarymo aktyvacijos energija yra daug mažesnė, negu tiesiogiai substrato molekulėms virstant produktu. Taigi, **fermentai pagreitina medžiagų virsmus sumažindami aktyvacijos energiją**.

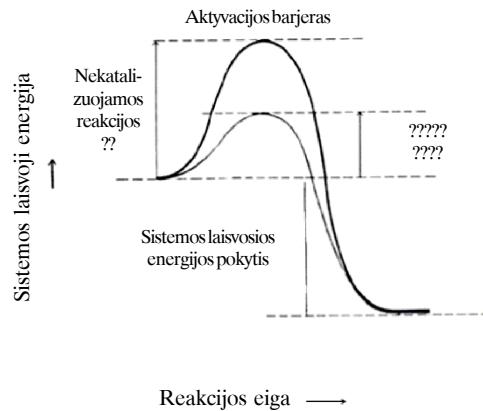
10.2.1 Fermentų struktūra ir veikimo ypatumai

Katalizinis fermentų aktyvumas priklauso nuo natyvios baltymo struktūros buvimo. Kaitinant, veikiant denatūrujančiais reagentais, keičiant H^+ koncentraciją ar veikiant peptidazėmis (fermentais skaidančiais baltymus), katalizinis aktyvumas sumažėja arba visai panaikinamas. **Baltymas yra kataliziškai aktyvus, kai pirminė, antrinė ir tretinė jo struktūros nepažeistos.**

Yra fermentų, kurie sudaryti tik iš aminorūgščių liekanų ir neturi jokių kitų cheminių grupių (pvz., kasos ribonukleazė). Tačiau daugelio fermentų aktyvumui pasireikšti yra būtiniai papildomi cheminiai sandai – **kofaktoriai**. Tai gali būti metalų jonai (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^+ ir kt.) ar sudėtingų organinių junginių molekulės, vadinamos **kofermentais** (dažnai kofermentais būna vitaminai ar jų dariniai: tiamindifosfatas – B_1 , piridoksalfosfatas – B_6 , nikotinamidiniai, flavininiai kofermentai ir kt.).

Kofermentai tiesiogiai dalyvauja reakcijoje ir dažnai atlieka atomų ar funkciinių grupių nešiklių vaidmenį.

Daugelio fermentų kataliziniams aktyvumui yra būtinas tiek kofermentas, tiek metalo jonai. **Baltymas (apofermentas) kartu su kofermentu yra vadinamas holofermentu.**



10.1 pav. Nekatalizuojamos ir katalizuojamos reakcijos potencinė kreivė

Nedidelė, bet labai svarbi fermento molekulės dalis yra jos **aktyvusis (katalizinis) centras**, kurį suformuoja baltymą sudarančių aminorūgščių liekanų atitinkamos funkcinės grupės. Aktyvujį centrą sudarančios aminorūgščių liekanos gali būti gana nutolusios viena nuo kitos pirminėje baltymo struktūroje. Jos suartėja dėl polipeptidinės grandinės erdvino išsidėstymo. 1894 m. Emilio Fišeris (E. Fischer) pasiūlė hipotezę, kuria remiantis aktyvusis fermento centras turi atitikti substrato molekulės konformaciją („spyna“ ir „raktas“ modelis).

Substrato molekulė privalo turėti du struktūros elementus – **savitajių cheminių ryšių**, kurį atakuoją fermentas ir **funkcines grupes, surišančias substratą su aktyviuoju fermento centru** taip, kad atakuojamas ryšys būtų tinkamu būdu orientuotas fermento katalizinių grupių atžvilgiu.

Vieni fermentai yra visiškai saviti konkretiam substratui, kiti sąveikauja su įvairiu substratų konkretiomis vietomis. Pavyzdžiui, aspartazė prijungia amoniaką tik prie fumaro rūgšties dvigubojo ryšio (susidaro L-aspartatas). Šio fermento substratu negali būti jokia kita nesočioji rūgštis. Platesnio savitumo pavyzdys galėtų būti peptidazės, skaidančios peptidų ir polipeptidų peptidinius ryšius.

Daugelio fermentų veikimą galima nusloplinti paveikus tam tikrais cheminiais reagentais, vadinamais **slopikliais** (inhibitoriais). Slopiklių veikimo tyrimai suteikia duomenų apie fermentų aktyviojo centro funkcinės grupes, katalizės mechanizmą, substratinį fermentų savitumą ir laštelii medžiagų apykaitos kelius.

Fermentui reaguojant su slopikliu (I) susidaro fermento slopiklio (EI) kompleksas. Atsižvelgiant į EI komplekso tvirtumą, slopinimas gali būti **grįžtamasis ir negrįžtamasis**.

Negrīžtamojo slopinimo atveju slopiklis stipriai susiriša su fermento molekule ir EI kompleksas labai lėtai skyla.

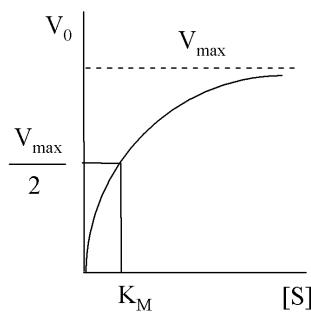
Grīžtamojo slopinimo metu slopiklis silpnai susiriša su fermentu ir, sumažinus slopiklio koncentraciją (dializuojant ar skiedžiant tirpalą) fermento ir slopiklio kompleksas lengvai skyla į laisvą fermentą ir slopiklį, fermento aktyvumas atsinaujina. Grīžtamasis slopinimas skirtomas į konkurencinį, nekonkurencinį, bekonkurencinį, mišrujį ir kitus.

Esant **konkurenciniam slopinimui**, slopiklis ir substratas jungiasi prie tos pačios fermento vietas, prie aktyviojo fermento centro. Didelės substrato koncentracijos mažina slopiklio veikimą. Substratas ir slopiklis turi panašias struktūras ir konkuruoja vienas su kitu dėl susirišimo su fermentu.

Nekonkurencinio slopinimo atveju substratas ir slopiklis reaguoją ne su ta pačia fermento vieta ir substrato perteklius nesumažina slopiklio poveikio. Nekonkurencinio slopinimo metu substratas ir slopiklis nekonkuruoja tarpusavyje.

Bekonkurencinio slopinimo atveju slopiklis nesijungia su fermentu, kai reakcijos terpėje nėra substrato. Slopiklis susijungia su ES. Reakcija slopinama susidarius EIS kompleksui.

10.3. Fermentinių reakcijų greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos

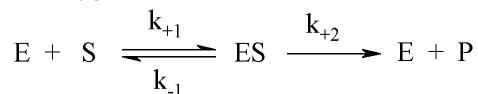


10.2 pav. Fermentinės reakcijos greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos

Substrato koncentracija, reakcijos terpės pH ir temperatūra turi didelės įtakos fermentinių reakcijų greičiui.

Fermentinės reakcijos greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos aprašomas hiperbole ir pavaizduotas 10.2 pav. Esant mažoms substrato koncentracijoms, reakcijos greitis tiesiogiai priklauso nuo substrato koncentracijos. Toliau didinant substrato koncentraciją reakcijos greitis lėtėja ir asymptotiškai artėja prie V_{max} , bet niekuomet jo nepasiekia.

Paprastiausia fermentinė reakcija yra aprašoma tokia lygtimi:



- k_{+1} – fermento ir substrato komplekso susidarymo reakcijos greičio konstanta
- k_{-1} – fermento ir substrato komplekso skilimo į substratą ir fermentą reakcijos greičio konstanta
- k_{+2} – fermento ir substrato komplekso skilimo į produktą ir fermentą reakcijos greičio konstanta

Šiuo atveju reakcija atliekama taip, kad susidariusio produkto koncentracija yra nedidelė ir nevyksta grižtamoji reakcija. Tokios reakcijos greitis priklauso nuo susidariusio fermento ir substrato komplekso koncentracijos ir jo skilimo į produktą greičio. Tuo atveju, kai substrato koncentracija yra tiek didelė, kad visas reakcijoje dalyvaujantis fermento kiekis sudaro fermento ir substrato kompleksą, reakcija vyksta didžiausiui greičiu – V_{max} . L. Michaelis ir M. Menten apskaičiavo fermentinės reakcijos greičio priklausomumą nuo substrato koncentracijos. Jie matavo pradinį reakcijos greitį (V_0), kai susidariusio reakcijos produkto koncentracija yra labai maža. Fermentinės reakcijos greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos išreiškiamas lygtimi:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Vienas svarbiausių kinetinių fermentinės reakcijos parametrų (rodiklių) yra Michaelio konstanta – K_M , kuri yra tiesioginės ir atvirkštinės fermentinės reakcijos greičių konstantų santykis:

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k_{+1}}$$

K_M yra išreiškiama koncentracijos vienetais (M). **Michaelio konstanta yra lygi substrato koncentracijai, kuriai esant reakcijos greitis yra lygus pusei didžiausio (maksimalaus) greičio.**

K_M galima nustatyti iš grafiko pažymėjus reakcijos greičio priklausomumą nuo substrato koncentracijos (10.2 pav.), tačiau ši reikšmė yra netiksli, nes neįmanoma tiksliai nustatyti V_{max} .

Norint iš bandymo duomenų nustatyti K_M ir V_{max} reikšmes, dažniausiai vartojamos dvigubos atvirkštinės Lainuivero ir Berko (Lineweaver-Burk) koordinatės – pažymima $1/V_0$ priklausomybė nuo $1/[S]$.

Pažymėjus bandymo metu gautus taškus, per juos nubrėžiama tiesė, kertanti koordinatių ašis. Abscisių ašyje tiesė susikerta taške, atitinkančiame $-1/K_M$, o ordinačių ašyje – taške $1/V_{max}$. Tiesės posvyrio kampus yra lygus K_M/V_{max} .

Pastaba:

Sudėtingiemis fermentams, turintiems ne tik aktyviuosius, bet ir reguliacinius (alosterinius) centrus, Michaelio ir Menten kinetikos dėsninių netaikomi.

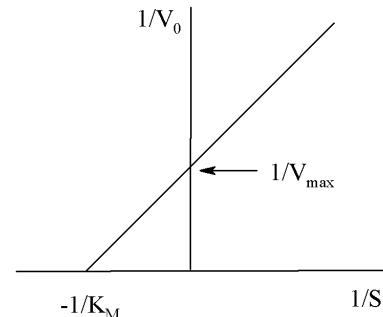
Pradinis reakcijos greitis yra matuojamas, esant pastoviam fermentinės reakcijos greičiui, t.y. tada, kai tenkinamos **stacionariosios (nuostoviosios) būsenos** sąlygos. Juo ilgiau trunka nuostovusis vyksmas, tuo patogiau ir tiksliau galima išmatuoti pradinį reakcijos greitį.

Pradinio reakcijos greičio fazę apibūdina pastovus greitis, t. y. vienodai didėjantis reakcijos produkto kiekis. Tai trunka keletą –

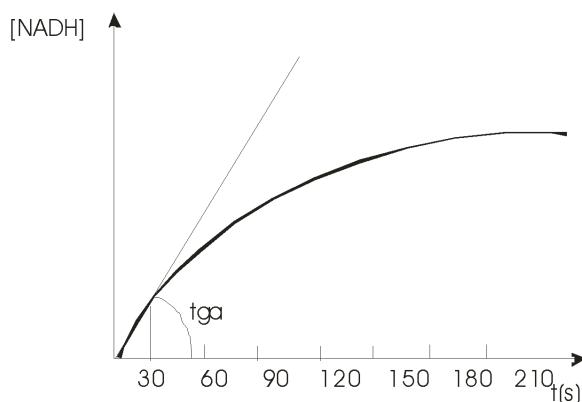
keliasdešimt sekundžių po reagentų sumaišymo ir priklauso nuo reakcijos sąlygų. Nubraižius fermentinės reakcijos greičio priklausomumo nuo substrato koncentracijos grafiką, išvedama liestinę, einanti per koordinatių pradžios tašką. Pradinis reakcijos greitis nustatomas iš tiesės posvyrio kampo:

$$V_0 = d[P]/dt = \text{tg}\alpha$$

Kampo, kurį sudaro liestinė su abscisių ašimi, tangentą apskaičiuojame iš stačiojo trikampio statinių santykio. Reakcijos greitis išreiškiamas substrato koncentracijos pokyčiu per minutę.



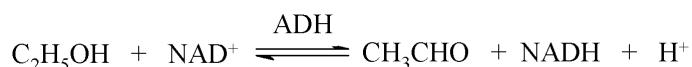
10.3 pav. Reakcijos greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos Lainuivero-Berko koordinatėse



10.4 pav. Pradinio reakcijos greičio nustatymas

10.4. Alkoholio dehidrogenazės katalizuojamos reakcijos pradinio reakcijos greičio nustatymas

Alkoholio dehidrogenazė (ADH) katalizuoja šią reakciją:

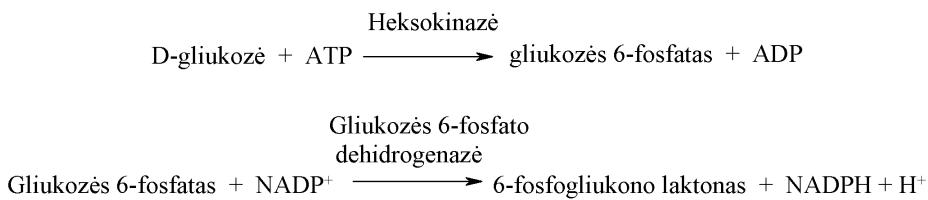


Alkoholio dehidrogenazė (1.1.1.1) yra oksidoreduktazė (katalizuoja oksidacijos–redukciųjų reakcijas). Mielių ADH molekulinė masė yra 141 kDa. Fermento molekulė sudaryta iš keturių subvienetų, ji turi keturis tvirtai surištus Zn atomus. Mielių ląstelėse reakcijos pusiausvyra yra nukreipta acetaldehydo redukcijos iki etanolio kryptimi. Tai paskutinė alkoholinės fermentacijos stadija. *In vitro* fermentas dažniausiai tiriamas ir naudojamas šarminėje pH srityje, t. y. sąlygomis, kurios nukreipia reakcijos pusiausvyrą etanolio oksidacijos kryptimi.

Reakcijos greitis nustatomas matuojant NADH koncentracijos didėjimą. Tai patogu atliliki pamatuojant spektrofotometru optinių tankių, esant šviesos bangos ilgiui $\lambda = 340$ nm.

Šia savybe pasinaudojama tiriant procesus, kuriuos katalizuoja nikotinamidinius kofermentus turinčios dehidrogenazės. Vykstant **oksidacijos – redukcijos procesams** labai patogu stebėti **vienos kofermento formos virtimą kita**, stebint NADH koncentracijos kitimą (didėjimą ar mažėjimą) reakcijos mišinyje.

Šis metodas taikomas ir vadinamiesiems “coupled assay” – sujungtiems (konjunguojiems) testams (pvz., heksokinazės) aktyvumui įvertinti, ATP koncentracijai nustatyti, kai sistemoje **kaip pagalbinis fermentas naudojama** gliukozės 6-fosfato dehidrogenazė.



Pamatavus optinį tankį tam tikru laiko momentu, galima apskaičiuoti NADH (NADPH) koncentraciją reakcijos mišnyje tuo laiko momentu.

$$c = A / \Sigma_M \cdot l$$

c – matuojamos medžiagos koncentracija (M),

A – optinis tankis (esant $\lambda = 340 \text{ nm}$),

ϵ_M – molinės ekstinkcijos koeficientas ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

l – kiuvetės plotis (cm).

NADH molinės ekstinkcijos koeficientas $\Sigma_M = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Alkoholio dehidrogenazės aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris redukuoja 1 μmol NAD^+ per 1 min. standartinėmis (griežtai apibrėžtomis) sąlygomis.

Savitasis fermento aktyvumas išreiškiamas aktyvumo vienetais vienam mg baltymo (U/mg).

Darbo tikslas:

1. Nustatyti pradinio reakcijos greičio priklausomumą nuo fermento kieko.
2. Ištirti pradinio reakcijos greičio priklausomumą nuo substrato (etanolio) koncentracijos.
3. Įvertinti tiriamos reakcijos kinetinius parametrus (K_M , V_{max}).

10.4.1. Pradinio reakcijos greičio priklausomumo nuo fermento kieko nustatymas

Reagentai:

1. 100 mM TRIS HCl buferis, pH 8,8 .
2. 25 mM kalio fosfato buferis pH 7,5.
3. 1 mg/ml NAD⁺ (tirpinama 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5)
4. 3 M etanolis
5. 1 mg/ml ADH (liofilizuotas fermentas tirpinamas 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5).

Darbo eiga:

- Į spektrofotometro kiuvetę įpilama: 2,8 ml Tris-HCl buferio pH 8,8; 0,1 ml (100 µl) 3 M etanolio ir 0,1 ml (100 gčl) NAD⁺.
- Kiuvetė dedama į spektrofotometro šulinėlį ir prietaisas nustatomas taip, kad rodytų optinį tankį lygū 0, esant bangos ilgiui $\lambda = 340$ nm.
- Kelias minutes stebima (arba užrašoma savirašiu), ar vyksta tuščioji (blank) reakcija (ar nesikeičia tirpalo sugertis, t. y. NADH susidaro ir nesant kiuvetėje fermento).
- Į kiuvetę, kurioje stebétas tuščiojo bandymo greitis, pridedamas tam tikras fermento tirpalo kiekis (10, 20, 30, 40, 50 µl), greitai išmaišoma ir kas 15 – 30 sek. 3–4 min. matuojamamas tirpalo optinis tankis. Reikia parinkti tokią fermento koncentraciją, kad susidariusio NADH kiekis tiesiškai didėtų laiko atžvilgiu, t. y. per vienodą laiko tarą (pvz., kas 30 sek.) tirpalo optinis tankis padidėtų tuo pačiu dydžiu. Taisyklingsi matavimai yra, jei optinis tankis, esant bangos ilgiui 340 nm, per minutę pakinta 0,02 – 0,04 vieneto ($\Delta A_{340/min} = 0,02 – 0,04$).
- Atsižvelgiant į nustatytus duomenis, grafiškai pažymimas **optinio tankio priklausumumas nuo laiko** (ordinacių ašyje pažymimas A_{340} , abscisių – laikas sekundėmis). Pridedamo fermento kiekis taip parenkamas, kad grafikas būtų kuo panašesnis į tiesę. Atsižvelgus į šio bandymo rezultatus apskaičiuojama **NADH koncentracija (µM)** kiekvienu laiko momentu, t. y. praėjus 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 sek. nuo reakcijos pradžios.
- Užpildoma 10.1 lentelė :

10.1 lentelė. Susidariusio NADH koncentracijos priklausumumas nuo reakcijos trukmės

Reakcijos trukmė, sek.	A_{340}	[NADH], µM
15		
15		
30		
45		
60		
75		
90		
120		
150		
180		

- Nubraižomas susidariusio **NADH koncentracijos priklausomumo nuo laiko grafikas** (ordinacių ašyje pažymima NADH koncentracija, abscisių – reakcijos trukmė). Esant optimaliam fermento kiekiui, susidariusio NADH koncentracija tiesiškai priklauso nuo laiko. Tuo atveju pradinis reakcijos greitis skaičiuojamas

atsižvelgiant į tiesės posvyrio kampo tangentą. Esant didesniams už optimalų fermento kiekiui, grafikas yra kreivės formos. Gautai kreivei nubrėžiama liestinė, ir apskaičiuojamas **pradinis reakcijos greitis (V_0)**.

8. V_0 taip pat nustatomas esant dar kelioms ADH koncentracijoms.
9. **Nubraižomas V_0 priklausomumo nuo fermento kiekio grafikas :** ordinačių ašyje pažymimas V_0 , abscisių – fermento kiekis .

10.4.2. Pradinio reakcijos greičio priklausumumas nuo etanolio koncentracijos

Reagentai:

1. 100 mM TRIS HCl buferis, pH 8,8 .
2. 25 mM kalio fosfato buferis pH 7,5.
3. 1 mg/ml NAD⁺ (tirpinama 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5
4. 3 M etanolis
5. 1 mg/ml ADH (liofilizuotas fermentas tirpinamas 25 mM kalio fosfato buferyje, pH 7,5).

Darbo eiga:

1. Nustatomas pradinis reakcijos greitis (V_0), esant skirtingoms etanolio koncentracijoms.
2. Į kiuvetę pilami skirtingi etanolio kiekiei (25 µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl). Šios reakcijos pradedamos pridedant į kiuvetę anksčiau atrinktą optimalų fermento kiekį.
3. Nubraižomas susidariusio **NADH koncentracijos priklausomumo nuo laiko grafikas**, esant skirtingoms etanolio koncentracijoms ir **vertinamas pradinis reakcijos greitis**. Užpildoma 10.2 lentelė

10.2 lentelė. Reakcijos greičio priklausumumas nuo etanolio koncentracijos

Pridedamo etanolio kiekis, µl	Etanolio koncentracija mėginyje, µM	Pradinis reakcijos greitis, µM/min.	$1/V_0$	$1/[S]$
25				
50				
100				
150				
200				
300				

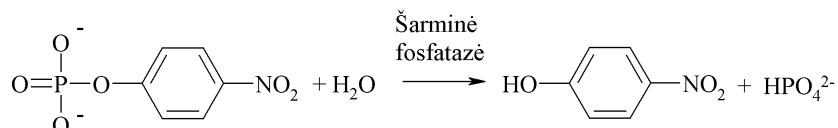
4. Nubraižomas reakcijos greičio priklausomumo nuo etanolio koncentracijos grafikas (Lainuiverio ir Berko koordinatėse).
5. Apskaičiuojma Michaelio konstanta K_M ir maksimalus reakcijos greitis V_{max}

10.5. Šarminės fosfatazės iš *E. coli* pradinio reakcijos greičio nustatymas

Šarminė fosfatazė (EC 3.1.3.1) katalizuoja fosforo rūgšties liekanos atskėlimą nuo monoesterintų junginių galo. Ji plačiai taikoma ribo- ir deoksiribonukleotidų galiniams fosfatui pašalinti.

Šarminė fosfatazė (AP – Alkaline Phosphatase) iš *E. coli* yra dimerinis baltymas, į kurio sudėtį jeina Zn^{2+} ir Mg^{2+} . Du Zn^{2+} jonai yra būtini fermento molekulės aktyvumui atsirasti. Mg^{2+} didina Zn -turinčio apofermento aktyvumą. Fermento veikimą slopina neorganinis fosfatas.

Fermento aktyvumas nustatomas vartojant Gereno ir Levintalio (Garen ir Levinthal, 1960) metodiką. Apie reakcijos greitį sprendžiama iš optinio tankio 405–420 nm srityje padidėjimo, atsirandančio dėl susidariusio p-nitrofenolio (p-NP).



Fermento vienetu laikomas fermento kiekis, kuris išskiria 1 μmol p-nitrofenolio per 1 min., esant 25°C temperatūrai, pH 8, apibrėžtomis sąlygomis.

Darbo tikslas:

1. Nustatyti pradinio reakcijos greičio priklausumą nuo fermento kiekiei.
2. Ištirti pradinio reakcijos greičio priklausumą nuo substrato (p-NPP) koncentracijos.
3. Ivertinti tiriamos reakcijos Michaelio konstantą ir maksimalų reakcijos greitį.

Reagentai:

7. 1,5 M TRIS HCl buferis pH 8,0.
8. 0,003 M p-nitrofenilfosfatas (p-NPP).
9. 0,03 M p-nitrofenilfosfatas (p-NPP).
10. Fermento tirpalas.

Parenkama tokia fermento koncentracija, kad stebint sugerties kitimą ties 410 nm ilgio bangą, sugerties pokytis per minutę ($\Delta A_{410}/\text{min.}$) būtų 0,02 – 0,04.

Darbo eiga:

1. Spektrofotometras nustatomas ties 410 nm ilgio bangą.
2. Į kiuvetę pilama 2 ml Tris-HCl buferio pH 8,0 ir 1 ml 0,003 M p-NPP.
3. 4–5 min. stebimas tuščiasis (blank) greitis, vėliau pridedama 0,1 ml praskiesto fermento.
4. 3–5 min. stebimas sugerties kitimas.

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas iš formulės :

$$U/mg = \frac{\Delta A_{410}/\text{min.} \times 1000}{1,62 \times 10^4 \times \text{mg fermento/ml reakcijos mišinio}}$$

kur $1,62 \times 10^4$ yra p-nitrofenolio (p-NP) molinės ekstinkcijos koeficientas.

10.5.1. Pradinio reakcijos greičio priklausomumo nuo fermento kieko nustatymas

Reagentai:

1. 1,5 M TRIS HCl buferis pH 8,0.
2. 0,003 M p-nitrofenilfosfatas (p-NPP).
3. 0,03 M p-nitrofenilfosfatas (p-NPP).
4. Fermento tirpalas.

Parenkama tokia fermento koncentracija , kad stebint sugerties kitimą ties 410 nm ilgio bangą, sugerties pokytis per minutę ($\Delta A_{410}/\text{min.}$) būtų 0,02 – 0,04.

Darbo eiga:

1. Į kiuvetę, kurioje stebėtas tuščiasis (blank) greitis, pilamas tam tikras fermento tirpalo kiekis (10–100 μ l), gretai išmaišoma ir kas 15–30 sek. 3–4 min. matuojamas tirpalo optimis tankis.
2. Reikia parinkti tokią fermento koncentraciją, kad susidariusio p-NP kiekis tiesiškai didėtų laiko atžvilgiu, t. y. per vienodą laiko tarpu (pvz., kas 30 sek.) tirpalo optimis tankis padidėtų tuo pačiu dydžiu.
3. Grafiškai pažymima optimio tankio priklausomybė nuo laiko (ordinačių ašyje pažymima A_{410} , abscisių – laikas sekundėmis). Pilamo fermento kiekis parenkamas taiip, kad grafikas būtų kuo panašesnis į tiesę.
4. Apskaičiuojama p-NP koncentracija (μ M) kiekvienu laiko momentu, t. y. praėjus 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240 sek. nuo reakcijos pradžios. Užpildoma 10.3 lentelė.

10.3 lentelė. Susidariusio p-NP koncentracijos priklausomumas nuo reakcijos trukmės

Reakcijos trukmė, sek.	A ₄₁₀	[p-NP], μM
15		
30		
45		
60		
90		
120		
150		
180		
210		
240		

5. Nubraižomas susidariusio p-NP koncentracijos priklausomybės nuo laiko grafikas (ordinacijų ašyje pažymima p-NP koncentracija, abscisių – reakcijos trukmė). Sudarytai kreivei nubrėžiama liestinė ir apskaičiuojamas pradinis reakcijos greitis (V_0) (žr. 10.4).

10.5.2. Pradinio reakcijos greičio priklausomumo nuo p-NPP koncentracijos nustatymas

Reagentai:

- 1,5 M TRIS HCl buferis pH 8,0.
- 0,003 M p-nitrofenilfosfatas (p-NPP).
- 0,03 M p-nitrofenilfosfatas (p-NPP).
- Fermento tirpalas.

Parenkama tokia fermento koncentracija, kad stebint sugerties kitimą ties 410 nm ilgio bangą, sugerties pokytis per minutę ($\Delta A_{410}/\text{min.}$) būtų 0,02–0,04.

Darbo eiga:

- Nustatomas pradinis reakcijos greitis (V_o), esant skirtinoms p-NPP koncentracijoms.
- Į kiuvetę, kurioje stebėtas tuščiasis (blank) greitis, į kiuvetę pilami skirtinį 0,03 M p-NPP kiekiai (100 μl, 250 μl, 500 μl, 750 μl, 1000 μl). Pilant mažesnius, kaip 1000 μl p-NPP tūrius, atitinkamai didinamas pilamo buferio tūris, kad suminis buferio ir substrato tūris būtų 3 ml.
- Šios reakcijos pradedamos pilant į kiuvetę anksčiau atrinktą optimalų fermento kiekį.
- Apskaičiuojama susidarančio p-NP koncentracija.
- Nubraižomas susidariusio p-NP koncentracijos priklausomumo nuo laiko grafikas ir apskaičiuojami pradiniai reakcijos greičiai (V_0). Užpildoma 10.4 lentelė.

10.4 lentelė. Reakcijos greičio priklausomumas nuo p-NPP koncentracijos

Dedamo p-NPP kiekis, μl	p-NPP koncentracija mėginyje, μM	Reakcijos greitis, $\mu\text{M}/\text{min.}$	$1/V_0$	$1/[S]$
100				
250				
500				
750				
1000				

6. Grafike pažymima V_0 priklausomumas nuo p-NPP koncentracijos Nubraižomas reakcijos greičio priklausomumas nuo substrato koncentracijos grafikas Lainuvero ir Berko koordinatėse.
7. Apskaičiuojame Michaelio konstantą ir maksimalų reakcijos greitį.

Literatūra:

- D. E. Metzler. Biochemistry. Harcourt/Academic Press. 2001. Vol.1. P. 454–503.
A. Glemža. Fermentai. Mokslas, 1987, p.109 – 158.
A. Praškevičius, L. Ivanovienė, N. Stasiūnienė, J. Burneckienė, H. Rodovičius, L. Lukoševičius, D. Kondratas. Biochemija. KMU leidykla, Kaunas, 2003, p. 122 – 160.
<http://www.worthington-biochem.com/ADH/>

Kontroliniai klausimai

1. Kaip apibūdinama fermentinė reakcija? Reakcijos substratų ir produktų samprata.
2. Fermentų struktūra (apofermentai, kofermentai, kofaktoriai, holofermentai). Kas yra aktyvusis fermento centras?
3. Kas lemia fermentinės reakcijos rūšį ir katalizės veiksmingumą. Fermentų savitumas.
4. Grįztamosios ir negrįztamosios reakcijos. Fermentinių reakcijų aktyvlikliai ir slopikliai.
5. Kuriose ląstelės dalyse yra sutelkti fermentai?
6. Kuo išreiškiamas reakcijos greitis? Kuo pasireiškia fermentinės reakcijos produktų įtaka reakcijos greičiui?
7. Kas yra pradinis fermentinės reakcijos greitis? Kaip grafiškai jis išreiškiamas?
8. Kokią reakciją katalizuoja alkoholio dehidrogenazė? Apibūdinkite nikotinamidinių kofermentų šviesos sugerties ypatumus.
9. Kur pritaikoma šarminė fosfatazė?
10. Kas yra molinės ekstinkcijos koeficientas? Kaip apskaičiuoti medžiagos koncentraciją atsižvelgiant į pamatuotą optinį tankį?
11. Kaip priklauso fermentinių reakcijų greitis nuo temperatūros, terpės pH ir substrato koncentracijos?

11. Priedai

11.1 lentelė. Daugikliai

m	(mili)	10^{-3}	k	(kilo)	10^3
μ (μ)	(mikro)	10^{-6}	M	(mega)	10^6
n	(nano)	10^{-9}	G	(giga)	10^9
p	(piko)	10^{-12}	T	(tera)	10^{12}
f	(femto)	10^{-15}	P	(peta)	10^{15}
a	(ato)	10^{-18}	E	(ekza)	10^{18}
z	(zepto)	10^{-21}	Z	(zeta)	10^{21}
			Y	(yota)	10

11.2.lentelė. Tam tikru medžiagų moliniai ekstinkcijos koeficientai

Junginys	λ_{max} nm	ϵ_{max} $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	λ_{max} nm	ϵ_{max} $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	λ_{max} nm	ϵ_{max} $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	pH
Triptofanas	280	5600	219	47000			7,0
Tirozinas	274	1400	222	8000	193	48000	7,0
Fenilalaninas	257	200	206	9300	188	60000	7,0
Histidinas	211	5900					7,0
Cisteinas	250	300					7,0
Hipoksantinas	248	10300					7,0
Guaninas	249	9100	273	7500			7,0
Guanozinas	252	13600	273	7500			7,0
Adeninas	261	13400					7,0
Adenozinas	259	14900					7,0
9-metiladeninas	260	14200					7,0
Citozinias	267	6100					7,0
Citidinas	271	9100					7,0
Uracilas	259	8200					7,0
Uridinas	261	10100					7,0
Timinas	264	7900					7,0
Timidinas	267	9700					7,0
DNR	258	6600					7,0
RNR	258	7400					7,0
Kofeinas	278	10900					7,0
Izokofeinas	239	7600	267	9000			7,0
Šlapimo rūgštis	238	9800	293	12200			7,0
NAD ⁺	260	18000					7,0
NADH	260	16900	340	6220			7,0

11.3 lentelė. UV ir regimosios šviesos bangų ilgiai

Tirpalo spalva	Spektro sritis	Šviesos bangų ilgiai, nm
Bespalvis	Ultravioletinė	220 ? 400
Geltonai žalia	Violetinė	400 ? 450
Geltona	Mėlyna	450 ? 480
Oranžiška	Žaliai mėlyna	480–490
Raudona	Mėlynai žalia	490 ? 500
Purpurinė	Žalia	500 ? 560
Violetinė	Geltonai žalia	560 ? 575
Mėlyna	Geltona	575 ? 590
Žaliai mėlyna	Oranžiška	590 ? 625
Mėlynai žalia	Raudona	625 ? 770

11.4 lentelė. Skystių pH

Sistema (tirpalas)	pH	Sistema (tirpalas)	pH
Seilės	6,35–6,85	Jūros vanduo	8,0
Žmogaus kraujas	7,35–7,45	Kiaušinio balymas	8,0
Skrandžio sultys	1,6–1,8	Apelsinų sultys	2,6–4,4
Ašaros	7,4	Pomidorų sultys	4,3
Šlapimas	4,8–7,5	Pienas	6,6–6,9

11.5 lentelė. Indikatorinių dažų savybės

Dažas	Rūgštis/bazė spalvos kitimas	Indikatoriaus naudojimo pH intervalas
Timolio mėlynasis	Raudona – geltona	1,2–6,8
Bromfenolio mėlynasis	geltona – mėlyna	1,2–6,8
Kongo raudonasis	mėlyna – raudona	3,0–5,2
Metiloranžinis	Raudona – geltona	4,3–6,1
Fenolis raudonasis	Geltona – raudona	6,8–8,2
Fenolftaleinas	Bespalvis – raudona	8,3–10,0

11.6 lentelė. Dažnai naudojami buferiniai tirpalai

Buferiai	Rekomenduojama naudoti pH sritis
Natrio citratas–citrinų rūgštis	3,0–6,2
Natrio acetatas–acto rūgštis	3,6–5,6
MES–NaOH	5,6–6,8
NaH ₂ PO ₄ – Na ₂ HPO ₄	5,8–8,0
Imidazolas–HCl	6,2–7,8
MOPS–KOH	6,6–7,8
Trietanolamino hidrochloridas–NaOH	6,8–8,8
TRIS–HCl	7,0–9,0
HEPES–NaOH	7,2–8,2
Tricinas–NaOH	7,6–8,6
Natrio tetraboratas–boro rūgštis	7,6–9,,2
Bicinas– NaOH	7,7–8,9
Glicinas–NaOH	8,6–10,6

KonstantosAvogadro skaičius, $N_A = 6.022045 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ Bolcmano konstanta, $k=1.380622 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$ Universalioji dujų konstanta, $R=8.31434 \text{ J/K*mol}$ **Nukleorūgščių molinės masės:**

bazės = 324.5Da

bazių pora = 649Da

ribo bazė = 340.5Da

1kb ds DNA (Na) = $6.5 \times 10^5 \text{ Da}$ 1kb ss DNA (Na) = $3.3 \times 10^5 \text{ Da}$ 1kb ss RNA (Na) = $3.4 \times 10^5 \text{ Da}$