

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 615.471:612.014.462.2/.6-08

А. Н. Бессонов, Н. Б. Гусев, В. Б. Ритов, В. А. Ткачук, В. В. Чубаров

ПРИБОР ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ МАЛЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ И pH И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

Кафедра биохимии животных Московского университета

Приводится описание прибора, позволяющего проводить измерения малых изменений оптической плотности и pH в одной и той же пробе, а также даны некоторые примеры его применения.

При изучении биологических объектов велика ценность методов, позволяющих одновременно регистрировать несколько параметров изучаемой системы. Такое комплексное исследование дает возможность полнее представить и точнее описать механизмы функционирования тех или иных клеточных органелл или индивидуальных белков. Так, при изучении фракции фрагментов саркоплазматического ретикулула (ФСР) было обнаружено, что аккумуляция этой фракцией ионов Са в среде, содержащей оксалат, сопровождается резким повышением активности АТФ-азы и увеличением оптической плотности суспензии ФСР [1]. С другой стороны, давно известно, что суспензия актомиозина или миофибрилл в определенных условиях способна к синерезису, также сопровождающемуся изменением оптической плотности и активности АТФ-азы. Для одновременной регистрации изменений оптической плотности и АТФ-азы актомиозина или ФСР было предложено несколько приборов. Эванс и Боуэн [2] измеряли оптическую плотность с помощью регистрирующего спектрофотометра, одновременно оценивая активность АТФ-азы актомиозина с помощью pH-стата. Гачечиладзе и Заалишвили [3] применили в аналогичных исследованиях отечественный спектрофотометр ОФ-4, а активность АТФ-азы регистрировали помощью стеклянного pH-электрода. В нашей лаборатории подобное исследование функций ФСР было проведено с помощью лабораторного фотоэлектроколориметра ФЭК-56 и потенциометра ЛПУ-01. В настоящей работе дано описание прибора, позволяющего регистрировать малые изменения оптической плотности и pH в одной и той же пробе; приведены и некоторые примеры его применения.

Описание прибора

Прибор состоит из 2 pH-метров ЛПУ-01, используемых в качестве измерителя изменений pH и усилителя постоянного тока, 2 самопишущих потенциометров ЭПП-09 со шкалой 10 мВ, колориметра-нефелометра ФЭК-56 и термостатируемой водяной бани, размеры которой соответствуют кюветному отделению ФЭК.

Для измерения малых величин оптической плотности и их регистрации фотоэлектрический колориметр ФЭК-56 модернизировали. На базе этого прибора был создан чувствительный дифференциальный двухлучевой фотометр, схема которого представлена на рис. 1. Сигналы эталонного и измерительного каналов выделяются на нагрузках R_1

и R_2 фотоэлементов. Разность сигналов подается на вход потенциометрического усилителя постоянного тока ЛПУ-01, имеющего большое входное сопротивление. Разностная схема позволяет уменьшить фон от нестабильности светового потока лампы. Усиленный сигнал с ЛПУ-01 подается на самопишущий потенциометр ЭПП-09 МЗ со шкалой 10 мВ. Система компенсации подаваемого сигнала односторонняя в обоих каналах (измерения рН и оптической плотности — см. рис. 1). Схема является линейной при измерении свето-

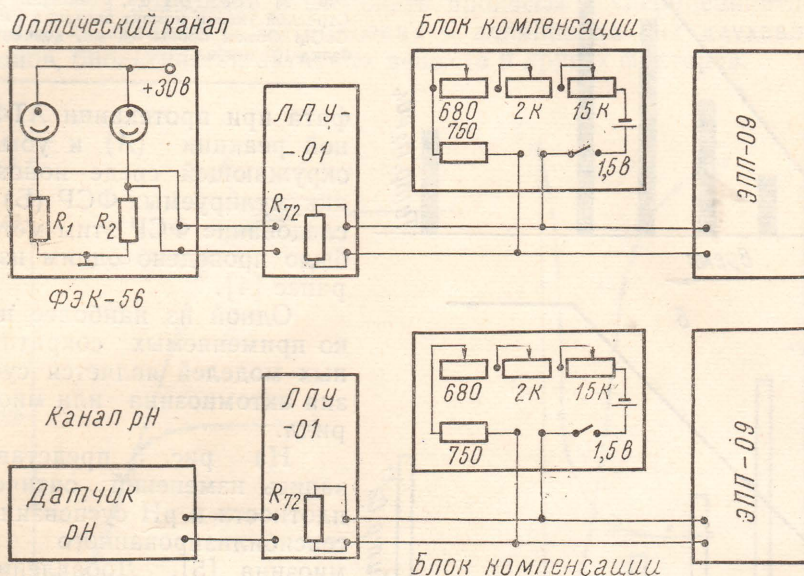


Рис. 1. Блок-схема прибора для одновременной регистрации изменений оптической плотности и рН.

Для увеличения чувствительности выходное сопротивление ЛПУ-01 R_{72} увеличено до 400 Ом, в разрыв цепи питания моста ЭПП-09 включено переменное сопротивление 1,5 ком.

пропускания, но при малых оптических плотностях шкала также линейна, причем погрешность в линейности можно рассчитать, исходя из формулы:

$$D = -\lg \tau,$$

где D — оптическая плотность; τ — коэффициент светопропускания.

Увеличением нагрузочных сопротивлений можно существенно повысить чувствительность канала измерения оптической плотности, которая ограничена сверху нестабильностью светового потока лампы накаливания. В качестве источника света используется лампа накаливания СЦ-98 со светофильтром, имеющим максимум пропускания при 435 нм. Измерения проводят в термостатированной кювете с длиной оптического пути 10 мм. Размешивание осуществляется либо стеклянной мешалкой (скорость вращения 1500 об/мин), либо винипластовой мешалкой, приводимой в движение вибропреобразователем. Чувствительность прибора по каналу измерения оптической плотности составляет 0,05—0,10 ед. опт. пл. на шкалу самопишущего потенциометра (220 мм) при уровне шумов не более 3%. рН измеряли при помощи стеклянного рН электрода ЭСЛ-41 Г-04.

Принципиальная схема канала для измерения рН также приведена на рис. 1. Чувствительность прибора по каналу измерения рН составляла 0,08—0,10 на всю шкалу регистратора при том же уровне шумов.

Примеры использования описанного прибора при исследовании биологических объектов

На рис. 2 представлены схема одновременной записи изменений рН (А) и оптической плотности (Б) в кювете с ФСР в процессе аккумуляции Ca^{++} в присутствии АТФ и оксалата. Изменение высоты столбиков пропорционально нарастанию количества неорганического фос-

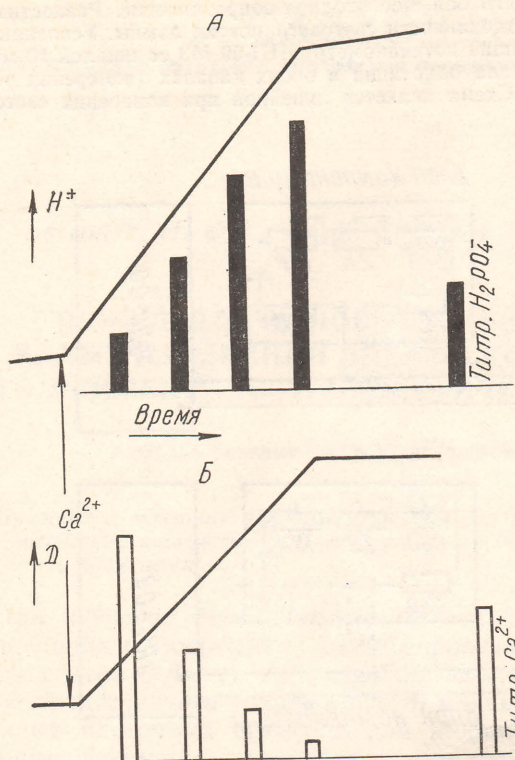


Рис. 2. Схема одновременной регистрации АТФ-азных (А) и Ca^{2+} -транспортирующих (Б) свойств фрагментов саркоплазматического ретикулула.

Условия инкубации: $1 \cdot 10^{-2}$ М имидазол, 0,1 М KCl , $2 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 , $5 \cdot 10^{-3}$ М оксалат, $2 \cdot 10^{-3}$ М АТФ; pH 6,8, температура 28°. Стрелкой указан момент введения 150 нмоль CaCl_2 . Объем пробы 3,8 мл, концентрация белка 100 мкг/мл.

фата при протекании АТФ-азной реакции (А) и убыли в окружающей среде ионов Ca аккумулируемых ФСР (Б). Исследование ФСР этим методом было проведено одним из нас ранее [4].

Одной из наиболее широко применяемых сократительных моделей является суспензия актомиозина или миофибрилл.

На рис. 3 представлена запись изменений оптической плотности и pH суспензии десенсибилизированного актомиозина [5]. Добавление к такой суспензии АТФ приводит к увеличению оптической плот-

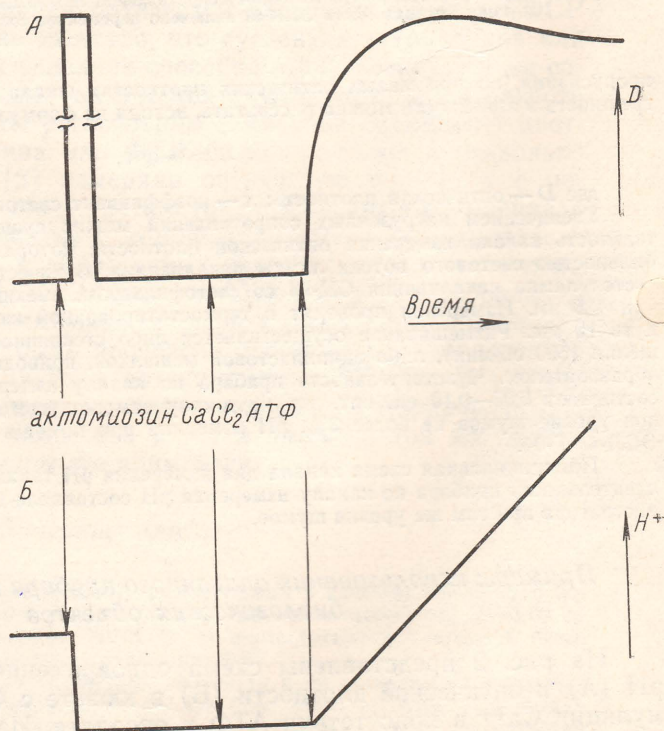


Рис. 3. Запись изменений оптической плотности (А) и АТФ-азной активности (Б) десенсибилизированного актомиозина.

Десенсибилизированный актомиозин получен методом [7]. Условия инкубации: 10^{-2} М трис- HCl ; pH 7,0, $7 \cdot 10^{-2}$ М KCl , 10^{-3} М MgCl_2 , температура 24°. Объем пробы 3,8 мл. Стрелками указан момент введения 230 мкг актомиозина, 380 нмоль CaCl_2 и 380 нмоль АТФ.

ности, что, по-видимому, отражает процесс образования актомиозинового комплекса. Вслед за этим начинается закисление среды, интенсивность которого отражает активность актомиозиновой АТФ-азы. Снижение оптической плотности, развивающееся в ряде случаев в процессе опыта, зависит от концентрации белка и скорости перемешивания и может быть связано с агрегацией частиц актомиозина [6]. Такая схема эксперимента позволяет исследовать процессы суперпреципитации и АТФ-азную активность актомиозина и влияние на них двухвалентных катионов, биологически активных веществ и других факторов.

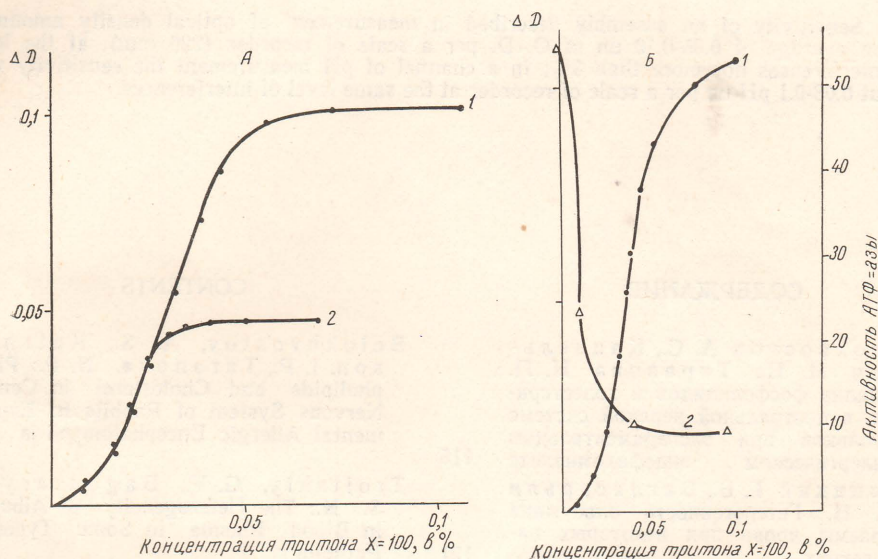


Рис. 4. Влияние тритона X-100 на солюбилизацию (А) и АТФ-азную активность (Б) мембран сарколеммы.

Условия инкубации: 10^{-2} М имидазол, $8 \cdot 10^{-2}$ М NaCl, $6 \cdot 10^{-2}$ М KCl, $3 \cdot 10^{-3}$ М MgCl, $3 \cdot 10^{-3}$ М АТФ; рН 7,4, температура 37°. Объем пробы 4 мл. А: концентрация белка: 1 — 55 мкг/мл; 2 — 27 мкг/мл; Б: 1 — солюбилизация (концентрация белка 55 мкг/мл); 2 — активность АТФ-азы в мкмоль неорганического фосфора в час на 1 мг белка.

По нашему мнению, этот прибор может быть использован для наблюдения за процессами солюбилизации мембранных препаратов под влиянием детергентов. Эксперименты такого рода были проведены на мембранных препаратах сарколеммы, обладающих активностью Na и K-АТФ-азы.

Изменения оптической плотности, регистрируемые на соответствующем канале при добавлении нарастающих количеств неионного детергента тритона-X 100 в пробы, содержащие различное количество мембранного препарата сарколеммы, представлены на рис. 4 (А). Форма кривой солюбилизации не изменяется, при увеличении количества белка в пробе кривая сдвигается в область больших количеств детергента. На рис. 4, Б сопоставлены кривые солюбилизации мембранного препарата и изменения его АТФ-азной активности, регистрируемые в аналогичных условиях.

Применение прибора не ограничивается сказанным. Его можно использовать при исследовании многих биологических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fairhurst A. S., Jenden D., *Analyt. Biochem.*, 1966, v. 16, p. 294.
2. Evans T. C., Bowen W. J., *Ibid.*, 1968, v. 25, p. 136.
3. Гачечиладзе Н. А., Заалишвили М. М. *Сообщ. АН Грузинск. ССР*, 1970, т. 59, с. 693.
4. Ри-

тов В. Б. Исследование биохимических механизмов мембранно-многофибриллярной связи. Автореф. дисс. канд. М., 1972. — 5. Stewart J. M., Levy H. M., J. biol. Chem., 1970, v. 245, p. 5764. — 6. Kominz D. R., Biophys. J., 1971, v. 11, p. 47.

Поступила 28/XI 1972 г.

AN ASSEMBLY FOR SIMULTANEOUS RECORDING OF SMALL CHANGES IN OPTICAL DENSITY AND pH AND ITS USE IN BIOLOGICAL EXPERIMENTS.

A. N. Bessonov, N. B. Gusev, V. B. Ritov, V. A. Tkachuk, V. V. Chubarov

Chair of Biochemistry of Animals, M. V. Lomonosov State University, Moscow.

Sensitivity of an assembly described in measurement of optical density amounted to an average of 0.05-0.10 un of O. D. per a scale of recorder (220 mm), at the level of interferences not more than 3%; in a channel of pH measurement the sensitivity was about 0.08-0.1 pH un per a scale of recorder at the same level of interferences.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

- | | | | |
|--|-----|---|--|
| Белохвостов А. С., Качнельсон И. П., Таранова Н. П. Анализ фосфолипидов и холестерина в центральной нервной системе кроликов при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите | 115 | Belokhvostov, A. S., Katsnelson, I. P., Taranova, N. P.: Phospholipids and Cholesterol in Central Nervous System of Rabbits in Experimental Allergic Encephalomyelitis | |
| Троицкий Г. В., Багдасарьян С. Н. Гетерогенность альбумина плазмы крови при некоторых патологиях | 121 | Troitskiy, G. V., Bagdasaryan, S. N.: The Heterogeneity of Albumin in Blood Plasma in Some Types of Pathology | |
| Цевелева И. А. Влияние радиационного поражения легких на обмен гликозаминогликанов | 127 | Tseveleva, I. A.: Effect of Irradiation Injury of Lungs on the Metabolism of Glycosoaminoglycans | |
| Брискин А. И., Спиричев В. Б., Драгнева Л. А., Баркова Л. В., Зеличенко М. И., Сумароков Д. Д. Действие тирокальцитонина при экспериментальном гипervитаминозе D у крыс | 132 | Briskin, A. I., Spirichev, V. B., Dragneva, L. A., Barkova, L. V., Zelichenok, M. I., Sumarokov, D. D.: Effect of Thyrocalcitonine in Experimental D-Hypervitaminosis in Rats | |
| Салганик Р. И., Неделькина С. В., Аргутинская С. В., Кусмарцева Л. П. Элиминация стероидных гормонов из организма животных как следствие гипериндукции микросомальных ферментов при длительном введении фенобарбитала | 135 | Salganick, R. I., Nedelkina, S. V., Argutinskaya, S. V., Kusmartseva, L. P.: Elimination of Steroid Hormones from Organism of Animal as a Result of a Hyperinduction of Microsomal Enzymes under Conditions of Prolonged Administration of Phenobarbital | |
| Неделькина С. В., Аргутинская С. В., Кусмарцева Л. П., Камерницкий А. В., Турута А. М., Салганик Р. И. Синтетические стероиды, подавляющие усиленную биотрансформацию стероидных гормонов, вызванную длительным введением животным фенобарбитала | 142 | Nedelkina, S. V., Argutinskaya, S. V., Kusmartseva, L. P., Kamernitsky, A. V., Turuta, A. M., Salganik, R. I.: The Inhibitory Effect of Synthetic Steroids on the Increased Biotransformation of Steroid Hormones, Caused by Prolonged Administration of Phenobarbital into Animals | |
| Кастрикина Л. Н., Лерман М. И. Воздействие хирургического сужения аорты на оборот РНК в клетках печени и почек крыс | 148 | Kastrikina, L. N., Lerman, M. I.: Effect of Surgical Stenosis of Aorta on Turnover of RNA in Rat Liver and Kidney Cells | |
| Суринов Б. П., Самгина Т. С., Румянцева И. А., Иващенко И. А. Активность изоформ эсте- | | Surinov, B. P., Samgina, T. S., Rumyantseva, I. A., Ivastchenko, I. A. Activity of Blood Serum Este- | |