

Manual of Methods for General Bacteriology

PHILIPP GERHARDT, Editor-in-Chief

Department of Microbiology and Public Health,
Michigan State University, East Lansing, MI 48824

R. G. E. MURRAY, Editor, I. Morphology

Department of Microbiology and Immunology,
University of Western Ontario, London, Ont., Canada N6A 5C1

RALPH N COSTILOW, Editor, II. Growth

Department of Microbiology and Public Health,
Michigan State University, East Lansing, MI 48824

EUGENE W. NESTER, Editor, III. Genetics

Department of Microbiology,
University of Washington, Seattle, WA 98195

WILLIS A. WOOD, Editor, IV. Metabolism

Department of Biochemistry, Michigan State University,
East Lansing, MI 48824

NOEL R. KRIEG, Editor, V. Systematics

Biology Department, Virginia Polytechnic Institute,
Blacksburg, VA 24061

G. BRIGGS PHILLIPS, Editor, VI. Laboratory Safety
Health Industry Manufacturers Association, 1030 15th Street, N. W.,
Washington, DC 20005

American Society for Microbiology Washington, DC 20006 1981

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

В ТРЕХ ТОМАХ

2

Под редакцией
Ф. ГЕРХАРДТА и др.

Перевод с английского под редакцией
чл.-корр. АН СССР Е. Н. КОНДРАТЬЕВОЙ
и проф. Л. В. КАЛАКУЦКОГО

МОСКВА «МИР» 1984

ББК 28.4

М 59

УДК 576.80.85

**М 59 Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Под
ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1984. — 472 с.,
ил.**

Фундаментальное руководство, написанное учеными США и Канады, по методам, широко используемым в современной бактериологии. На русском языке книга выходит в трех томах. Второй том посвящен генетическим методам и методам изучения обмена веществ бактерий.

Предназначена для специалистов, работающих во всех областях микробиологии.

М 2003000000—206

041(01)—84 Свод. пл. подписных изданий 1983

ББК 57 А

Редакция литературы по биологии

Часть III

ГЕНЕТИКА

ВВЕДЕНИЕ

Ю. Нестер

Бактериальная генетика с момента ее зарождения в сороковых годах нашего века, когда Ледерберг и Татум впервые продемонстрировали генетическую рекомбинацию у кишечной палочки, развивается необыкновенно быстро. В настоящее время работающие в этой области исследователи пришли к детальному пониманию механизмов, посредством которых гены бактерий мутируют, переносятся и рекомбинируют. Не удивительно, что рождение и развитие молекулярной биологии имеет параллели с развитием бактериальной генетики; благодаря инструментам и методам, созданным специалистами в области бактериальной генетики, молекулярные биологи были обеспечены материалом для изучения. Кишечная палочка не случайно представляет собой безусловно наиболее подробно изученный на молекулярном уровне организм: большинство исследований в области молекулярной биологии действительно зависит от тех генетических манипуляций, которые могут быть выполнены на этом микроорганизме. К инструментам исследований в бактериальной генетике относятся хорошо охарактеризованные мутанты, штаммы доноров и реципиентов, которые способны конъюгировать и рекомбинировать, и геномы, которые можно выделять, а затем анализировать генетически и биохимически.

В данной части руководства описана техника работы с каждым из этих инструментов. В гл. 13 рассматриваются различные методы индукции, отбора и определения свойств мутантов для двух бактерий, чаще других используемых в генетическом анализе, — *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Эти же методы с некоторыми модификациями позволяют исследователям выделять мутанты большинства остальных бактерий.

Перенос генов был описан для относительно немногих бактерий; число их продолжает расти по мере того, как лучше изучаются условия, позволяющие продемонстрировать это явление в лаборатории. В гл. 14 обсуждаются три известные системы переноса генов: трансформация, трансдукция и конъюгация. В некоторых случаях конкретные системы выбирались по той причине, что в них легко осуществим описываемый процесс (например, трансформация у *Acinetobacter calcoaceticus*). В других выбор определялся тем, что данная система изучается во многих лабораториях (например, трансдукция у *E. coli* с помощью бактериофага λ).

В гл. 15, посвященной плазмидам, описаны важнейшие методы выделения и характеристики молекул ДНК плазмид. Эти методы постоянно улучшаются, а для некоторых систем они публикуются здесь впервые (например, выделение плазмидной ДНК с большой молекулярной массой).

Авторы каждой из глав сами применяли большинство описываемых ими методов, поэтому они дают полезные рекомендации, а также обращают внимание на скрытые «подводные камни». В общем данная часть руководства должна оказаться полезной как тем, кто проводит эксперименты в области бактериальной генетики, так и тем, кто использует бактерии в качестве инструмента в молекулярнобиологических опытах.

Для общей подготовки читателю предлагаются на выбор несколько книг по бактериальной генетике [1—5].

Методы, связанные с использованием рекомбинантных молекул ДНК, дают бактериальной генетике новый мощный инструмент, значение которого трудно переоценить. Быстро меняющиеся методические подходы, их специальный характер и федеральные ограничения не позволяют включить эти методы в настоящее руководство. Мы отсылаем читателя, интересующегося этими вопросами, к тому «Методов энзимологии», посвященному рекомбинантной ДНК [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Broda P.* Plasmids. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1979.
2. *Falkow S.* Infectious multiple drug resistance. Pion Limited, London, 1975.
3. *Lewin B.* Gene expression, vol. 1: Bacterial genomes. John Wiley and Sons, London, 1974.
4. *Lewin B.* Gene expression, vol. 3: Plasmids and phages. John Wiley and Sons, London, 1977.
5. *Miller J.* Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1972. [Имеется перевод: Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976.]
6. *Wu R.* (ed.). Recombinant DNA. Methods Enzymol., **68**, 1—555, 1979.

МУТАЦИИ

Б. Кэрлтон, Б. Браун

Мутации, т. е. наследуемые изменения в генетическом материале, представляют собой важное биологическое явление. Будучи первоисточником всех биологических изменений, они наряду с механизмами переноса генов обуславливают генетическую изменчивость, составляющую материал для эволюции. Мутации и индукция новых мутаций мутагенами представляют собой ценный инструмент в генетических и биохимических исследованиях. Во-первых, изменения, которые вызывает мутация в определенном гене, позволяют не только идентифицировать этот ген, но и точно указать его место в хромосоме с помощью метода генетического картирования. Во-вторых, анализ мутантных штаммов, у которых нарушены различные этапы сложной цепи биохимических процессов, может вскрыть детали организации генетического и биохимического аппаратов. В-третьих, знание механизма действия различных мутагенов может помочь в установлении корреляций между мутагенным и канцерогенным действием множества факторов окружающей среды, таких, как химические агенты, радиоактивное излучение и другие физические факторы.

Для того чтобы использовать мутагенез в генетических экспериментах с бактериями, необходимо согласованно провести ряд последовательных этапов работы, а именно: 1) определить, какой тип мутанта соответствует цели исследования; 2) выбрать наиболее подходящий мутаген для индукции желаемой мутации; 3) создать условия для выражения новой мутации; 4) произвести обогащение по желаемому мутанту для повышения вероятности его выделения; 5) обнаружить новый мутант соответствующими прямыми и косвенными методами отбора; 6) изучить свойства мутанта и 7) картировать локус новой мутации, т. е. определить ее расположение в бактериальном геноме.

Методы, необходимые для осуществления первых шести этапов, описаны в разд. 13.1—13.7 этой главы; методы картирования рассматриваются в следующей главе.

В данной главе описано также два специальных метода: один из них касается выделения штаммов, у которых мутации локализованы в определенном участке бактериального генома (разд. 13.8.1), другой служит для оценки мутагенности различных канцерогенов (разд. 13.8.2). Рецепты приготовления сред даны в разд. 13.9, список поставщиков бактериальных штаммов, специальных реактивов и оборудования приведен в разд. 13.10. Литературные источники обзорного типа по мутагенезу и выделению мутантов перечислены в разд. 13.11.1, а ниже приведена специальная литература по отдельным методикам (разд. 13.11.2).

Подробные методики выделения мутантов определенного типа могут значительно различаться в зависимости от конкретных условий. Определенные штаммы, условия роста (среда, температура и т. д.) и концентрации мутагенов, оптимальные для одной бактерии, могут совершенно не годиться для другого вида и даже штамма того же вида. Поэтому методики, приведенные ниже, должны рассматриваться как отправная точка; при их налаживании в специальных целях или на других бактериях могут потребоваться значительные модификации.

13.1. ВЫБОР НУЖНОГО МУТАНТА

Начиная поиски необходимого мутанта, прежде всего следует четко представлять, какой именно тип мутанта соответствует поставленной задаче. Например, если нужно получить мутант с устойчивым генетическим маркером, позволяющим идентифицировать мутантный штамм на всех этапах эксперимента, следует искать штамм с неревертирующей мутацией, захватывающей группу смежных генов, такой, как *делеция*. Вместе с тем, если стоит задача выявить взаимосвязь между структурой какого-то белка и его функцией, наилучшими окажутся *точковые мутации* с заменой оснований, позволяющие отбирать ревертанты. Мутации с заменой оснований ча-

сто оказываются *миссенс-мутациями* (мутациями с изменением смысла), в которых последовательность кодирующего триплета оснований после замены кодирует уже другую аминокислоту. Вследствие вырожденности генетического кода аминокислота, кодируемая мутантным геном, часто оказывается сходной с той, которая кодировалась родительским триплетом, в результате чего формируется фенотип («leaky») лишь с частично нарушенной функцией (определяемой обычно белком). Такие штаммы имеют тенденцию спонтанно ревертировать к родительскому типу, проявляя таким образом генетическую нестабильность и частичную физиологическую неполноценность. Значительная часть мутаций с заменой оснований представляет собой *нонсенс-мутации* (бесмысленные мутации), характеризующиеся тем, что кодирующий какую-либо аминокислоту триплет превращается в триплет, не кодирующий никакой аминокислоты. В этом случае синтез соответствующего белка прерывается на измененном триплете, а образующийся незавершенный фрагмент белковой молекулы, как правило, не способен выполнять предназначенной исходному белку функции. Поэтому нонсенс-мутации фенотипически выражены, а способность ревертировать у них сохраняется. *Мутации со сдвигом рамки* возникают в случае вставки или делеции одного или нескольких оснований в молекулу ДНК. При этом происходит сдвиг рамки при считывании закодированной информации и как следствие — изменение последовательности аминокислот в белке мутантного штамма.

Если нужно получить мутант, генетический дефект которого нельзя компенсировать добавками питательных веществ (например, дефекты ферментов, участвующих в репликации ДНК и РНК, дефекты в каком-либо элементе белоксинтезирующего аппарата), его следует искать среди *условно летальных мутантов*, которые жизнеспособны лишь при определенных условиях. Примерами таких мутантов могут служить температурочувствительные мутанты и штаммы, несущие супрессорные нонсенс-мутации. В табл. 13.1 приведены свойства мутаций различных типов; она может служить ключом для выбора наиболее подходящего типа мутанта в соответствии с определенной целью.

Таблица 13.1. Структурно-функциональные характеристики мутаций у бактерий

Тип мутаций	Природа изменения в молекуле ДНК	Типы мутирующих генов	Влияние на функцию гена	Обратима ли мутация	Супрессируется ли мутация супрессорной тРНК
<i>Точковые мутации</i>					
Миссенс-мутации	Замены оснований	Гены, кодирующие белок	Различное	Да	Да
Нонсенс-мутации	То же	То же	Полная потеря функции ^а	»	»
Мутации со сдвигом рамки	Вставки или делеции оснований	»	То же ^а	» ^б	»
Остальные	Замены оснований	Регуляторные области; гены, кодирующие тРНК и рРНК	Различное	»	Нет
<i>Делеции</i>	Потеря участка ДНК	Все типы	Полная потеря функции	Нет	»
<i>Вставки</i>	Включение генома фага или транспозона	То же	То же	Да	»

^а Если мутация локализуется не очень близко к концу гена.

^б За счет компенсирующей мутации противоположного типа в другой точке.

13.2. ВЫБОР МУТАГЕНА

Независимо от конкретных условий применения мутагена его выбор определяется прежде всего двумя факторами: тем типом мутации, которую хотят получить (т. е. замена оснований, делеция или сдвиг рамки), и относительной эффективностью мутагена в отношении желаемой мутации. Для определенной цели могут подойти не одна, а несколько мутаций, в то же время нужную мутацию могут эффективно вызывать не один, а несколько мутагенов.

Многочисленные исследования по мутагенной специфичности различных типов излучений, а также химических и физических агентов показали, что, хотя многие мутагены вызывают изменения в ДНК лишь одного преобладающего типа, большинство мутагенов, помимо основного изменения, может вызывать изменения и других типов — с частотами от низкой до умеренной. Например, такие мутагены, как этилметансульфонат (ЭМС), нитрозогуанидин (НТГ), гидроксилламин и азотистая кислота, вызывают в основном простую замену пары GC на AT в двухцепочечной ДНК [10, 22, 23]. Однако все они вызывают незначительное число транзиций AT→GC, а также некоторые трансверсии. *Транзиция* — это замена в ДНК какого-либо одного пурина (аденина или гуанина) или пиримидина (тимина или цитозина) на другой пурин или пиримидин соответственно. *Трансверсия* — это такая мутация, при которой происходит замена пуринового основания на одно из двух пиримидиновых или наоборот.

Аналоги оснований, такие, как 2-аминопурин и 5-бром урацил, преимущественно вызывают транзиции типа AT→GC, но с гораздо меньшей частотой могут приводить к транзициям GC→AT. Такое отсутствие полной мутагенной специфичности обусловлено, вероятно, не только механизмом действия мутагена, но и локальным окружением мутирующего основания (влияние соседнего основания или вторичной структуры ДНК). (Эти представления обсуждаются в работе [23].) В связи с этим при оценке типа мутаций, вызываемых даже очень специфичными мутагенами, необходимо быть очень осторожными; для подтверждения выявленного

типа следует провести соответствующий анализ мутантов. Тем не менее можно считать, что большинство мутантов из числа индуцированных данным мутагеном будут принадлежать к одному типу, определяемому основной специфичностью мутагена. В табл. 13.2 приведены свойства некоторых наиболее часто используемых в бактериальной генетике мутагенов.

Мутагены не только увеличивают частоту мутаций: многие из них представляют собой сильнодействующие канцерогены — вещества, способные вызывать опухоли у млекопитающих [19]. Эймс и др. [7, 8] разработали бактериальную тест-систему для эффективного выявления корреляции этих двух свойств и показали, что многие канцерогены обладают также и мутагенной активностью. Подробности их метода будут в дальнейшем рассмотрены в настоящей главе (разд. 13.8.2).

Предупреждение. При работе с мутагенами особое внимание следует обратить на непосредственное обращение с ними и ликвидацию остатков. Растворы мутагенов ни в коем случае нельзя насасывать через пипетку ртом. При взвешивании и других количественных измерениях этих веществ необходимо надевать сменные перчатки. Чтобы избежать попадания мутагенов в организм с вдыхаемым воздухом, все манипуляции с их порошкообразными и летучими формами следует проводить под тягой. Растворы мутагенов нельзя сливать в раковину; лучше пропитать ими соответствующие твердые материалы (такие, как вермикулит) и поместить в герметичный контейнер, подобно другим опасным отходам. Если мутагены непосредственно используются в эксперименте в составе твердых или жидких питательных сред, термостаты, в которых инкубируются чашки или колбы, должны иметь искусственную вытяжку или не должны сообщаться с лабораторной атмосферой.

13.2.1. Ультрафиолетовый свет

Облучение ультрафиолетом представляет собой один из простейших и самых удобных способов получения разнообразных бактериальных мутантов. Для этого пригодны практически любые источники ультрафиолетового

света с испусканием в коротковолновой области (около 253,7 нм). Следует лишь один раз откалибровать источник для получения оптимальной дозы облучения.

Методика

1. Выращивают родительский бактериальный штамм в 50 мл L-бульона (разд. 13.9.1) или питательного бульона (разд. 13.9.11) при 37°C до плотности, близкой к $2 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл.

2. Культуру охлаждают во льду в течение нескольких минут для предотвращения дальнейшего роста, делят на порции по 5 мл и центрифугируют для осаждения клеток при 5000—6000 g 5 мин.

3. Ресуспендируют осадок каждой порции в 2,5 мл стерильного раствора 0,1 М $MgSO_4$ в дистиллированной воде. Необлученную суспензию, которая служит контролем, в разведении 10^{-6} — 10^{-7} вносят на L-агар (разд. 13.9.2).

4. В течение 15—20 мин прогревают ультрафиолетовую лампу (253,7 нм). Неразведенные суспензии переносят в стерильные стеклянные чашки Петри диаметром 100 мм, которые ставят под лампой (без крышек). Покачиванием чашек обеспечивают равномерное облучение суспензии. Время облучения от чашки к чашке рекомендуется последовательно увеличивать в 10 раз (например, от 15 с до 2,5 мин). Тем самым будет обеспечен диапазон летальности клеток.

5. Немедленно делают несколько десятикратных разведений каждой из суспензий; при слабом освещении разведенные суспензии высевают на L-агар (разд. 13.9.2) или питательный агар (разд. 13.9.12) для определения титра жизнеспособных клеток.

6. Остаток каждой из неразведенных облученных суспензий центрифугируют и осадок клеток ресуспендируют в 10 мл L-бульона (разд. 13.9.1).

7. Инкубируют клетки в течение ночи при 37°C в пробирках или колбах, обернутых алюминиевой фольгой, либо в темной комнате во избежание фотореактивации. Чтобы впоследствии получить ряд независимых мутантных штаммов, следует перед инкубацией разлить каждую облученную суспензию по нескольким пробиркам (разд. 13.3).

Возможные трудности

Относительное число клеток, погибших при облучении ультрафиолетом, сильно зависит от источника облучения и условий эксперимента. Для стандартизации условий облучения следует построить кривую выживания. В слишком концентрированных бактериальных суспензиях ($5 \cdot 10^8$ клетка/мл) при облучении имеет место эффект экранирования, обуславливающий неодинаковый процент гибели клеток. Оптимальные результаты дает доза в среднем около 500 эрг/мм^2 , и, если есть возможность воспользоваться дозиметром, нужно ориентироваться на эту цифру. Поскольку ультрафиолет — относительно слабый мутагенный фактор, наилучшие результаты получают при норме выживания от 0,1 до 1%. Наконец, следует по возможности уменьшить эффект фотореактивации. Этого добиваются точным соблюдением условий получения ультрафиолета (без примеси видимого света) и последующим выращиванием бактерий в полной темноте.

13.2.2. Нитрозогуанидин

Соединение с метильной группой N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НТГ) — один из самых мощных известных в настоящее время мутагенов бактерий. Он вызывает главным образом транзиции типа GC→AT, значительно реже — транзиции типа AT→GC, трансверсии и даже мутации со сдвигом рамки.

Методика

1. Выращивают клетки подходящего бактериального штамма до середины логарифмической фазы (концентрация $5 \cdot 10^8$ клетка/мл) в 10 мл L-бульона (разд. 13.9.1) или питательного бульона (разд. 13.9.11).

2. Культуру центрифугируют в течение 5 мин при 5000 g и осадок ресуспендируют в равном объеме трис-малеинового буфера (разд. 13.9.4), pH 6,0.

3. Добавляют к суспензии свежеприготовленный раствор НТГ (1 мг в 1 мл стерильной воды) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Инкубируют 30 мин при 37°C без встряхивания.

Таблица 13.2. Свойства некоторых часто используемых мутагенов

Тип мутагенного фактора	Предполагаемый механизм мутагенеза	Тип возникающей мутации	Относительная эффективность	Характерные особенности
<i>Радияция</i>				
Рентгеновские лучи, быстрые нейтроны	Преимущественно разрыв хромосом	Делеции, инверсии	Высокая	Возможны трудности с оборудованием
Ультрафиолет	Димеризация пиримидинов	Транзиции типа GC → AT, трансверсии, делеции	Средняя	Мутаген широкого спектра действия, процент гибели клеток должен точно соблюдаться, фотореактивация должна быть предотвращена
<i>Химические агенты</i>				
Аналоги оснований: 2-аминопурин, 5-бромурацил, 5-бромдезоксипуридин	Ошибки в репликации ДНК	Преимущественно транзиции типа AT → GC	Низкая	Относительно низкая эффективность
Гидроксиламин	Дезаминирование цитозина	Транзиции типа GC → AT	Низкая	Индуктирует главным образом транзиции GC → AT

Азотистая кислота	Деаминация цитозина и аденина	Транзиции в обоих направлениях, делеции	Средняя	
НТГ	Алкилирование оснований в репликативной вилке	Преимущественно транзиции типа GC→AT	Очень высокая	Высокая мутагенность при низком уровне летальности, вызывает множественные мутации на ограниченном участке
ЭМС	Алкилирование гуанина	Преимущественно транзиции GC→AT, отчасти транзиции AT→GC и трансверсии	Средняя	Мутагенные эффекты, сходные с эффектами НТГ, но меньшая склонность к множественным мутациям
Соединения группы ICR	Интеркаляция между основаниями во время репликации	Сдвиг рамки за счет вставки и делеции оснований	Высокая	Соединения могут оказывать труднодоступными
Акридиновые красители, бромистый этидий	То же	Сдвиг рамки, потеря внехромосомных элементов	Низкая	Особенно эффективны при излечивании клеток от плазмид
Новобиоцин	Блокирование репликации ДНК	Излечивание клеток от плазмид	Высокая	Очень эффективен в излечивании клеток от плазмид

4. Обработанную суспензию центрифугируют и осадок ресуспендируют в равном объеме минимальной среды М56 (разд. 13.9.8).

5. Суспензию вновь центрифугируют и осадок ресуспендируют в минимальной среде М56 (разд. 13.9.8). Этот метод, предложенный Эделбергом и др. [5], дает большой процент мутантов без излишней гибели клеток, имеющей место в богатой жидкой среде (по крайней мере для *E. coli*). Особенно эффективен этот метод для получения ауксотрофных мутантов (разд. 13.6.2).

Возможные трудности

Предупреждение. НТГ не только мощный мутаген, но и мощный канцероген! Поэтому всегда необходимо руководствоваться правилами, указанными в конце разд. 13.2.

Можно построить кривую гибели клеток под действием НТГ; для этого высеваяют разведения 10^{-6} культуры, обработанной НТГ в течение разных отрезков времени с интервалом 5 мин, и исходной необработанной культуры [4]. Условия, в которых проводится обработка НТГ, не должны приводить к гибели более чем 50% клеток — при повышении концентрации НТГ клеток погибнет больше, но среди выживших до 40% увеличится выход ауксотрофов [5].

Одна из потенциальных трудностей в работе с этим мутагеном заключается в том, что он может индуцировать множественные мутации в ограниченном участке бактериальной хромосомы [12]. У таких мутантов были бы очень сложные требования к питательной среде, так как их мутации затрагивали бы метаболические функции более чем одного типа; к тому же такие мутанты не могут ревертировать к дикому типу с ожидаемой частотой. Поэтому, прежде чем продолжать работу с мутантами, индуцированными НТГ, следует проверить возможность их реверсии к дикому типу (разд. 13.5.2).

13.2.3. Аналоги оснований

Аналоги оснований, включенные в молекулу ДНК, такие, как 5-бромурацил и 2-аминопурин, вызывают ошибки репликаций. Указанные аналоги могут сущест-

вывать в двух таутомерных формах—обычной кето-, или аминформе, и реже встречающейся енольной, или иминоформе. Каждая из форм имеет свою специфичность в отношении спаривания с другими основаниями. Поэтому переход в более редко встречающуюся таутомерную форму может привести к неправильному образованию пар во время репликации ДНК. Поскольку ошибки в образовании пар могут возникать на двух различных стадиях (в момент включения аналога и во время последующей репликации), они могут приводить к транзициям в обоих направлениях: $GC \rightarrow AT$ и, наоборот, $AT \rightarrow GC$. Однако показано, что и 5-бромурацил, и 2-аминопурин более эффективно вызывают транзиции типа $AT \rightarrow GC$, чем $GC \rightarrow AT$ [10, 22]. Ни один из этих агентов не имеет большого значения в масштабных работах по мутагенезу ввиду их низкой мутагенной активности. Последнее обусловлено, видимо, неспособностью указанных аналогов конкурировать с нормальными нуклеотидами. Зато эти аналоги полезны при изучении обратных мутаций, где чувствительность метода в отношении выявления редких мутаций высока (разд. 13.5.2).

Обработка 5-бромурацилом

Чтобы добиться существенного мутагенеза при действии 5-бромурацила, необходимо снизить внутриклеточную концентрацию тимина — природного аналога 5-бромурацила. Это можно осуществить с помощью мутанта, нуждающегося в экзогенном тимине, или предварительной обработкой клеток веществами, ингибирующими синтез тимина и тем самым снижающими уровень содержания в клетке самого тимина и его нуклеотидных и нуклеозидных производных. Тимин в норме синтезируется из дезоксиуридина при участии фермента тимидилатсинтетазы. В присутствии сульфаниламида — ингибитора синтеза фолиевой кислоты — в растущих клетках происходит истощение донора метильных групп и как следствие уменьшение содержания тиминовых нуклеозидов и нуклеотидов.

1. Клетки соответствующего бактериального штамма выращивают в течение ночи в минимальной среде (разд. 13.9.8 или 13.9.15), если по синтезу тимина он

относится к дикому типу (тиминнезависимый штамм), или в минимальной среде с тиминном (20 мкг/мл), если штамм дефектен по синтезу тимина (тиминзависимый штамм).

2. Для тиминнезависимых штаммов культуру разводят 1:25 в бульоне с сульфаниламидом (разд. 13.9.5), содержащем 50 мкг 5-бромурацила в 1 мл.

3. Инкубируют на качалке 5—6 ч при 35—37 °С.

4. Культуру центрифугируют (или фильтруют через бактериальный фильтр) и ресуспендируют клетки в свежей среде, состав которой способствует обогащению и (или) отбору, требуемым для получения мутанта желаемого типа.

2а. Культуру тиминзависимого штамма после инкубации в течение ночи центрифугируют, клетки ресуспендируют в минимальной среде (разд. 13.9.8 или 13.9.15), не содержащей тимина, но имеющей в своем составе кислый гидролизат казеина (0,1%) и 20 мкг/мл 1-триптофана.

3а. Проводят инкубацию 20—30 мин при слабом покачивании для полной утилизации клетками остатков тимина в среде.

4а. Добавляют 5-бромурацил до конечной концентрации 20 мкг/мл и продолжают инкубацию с покачиванием еще в течение 1 ч.

5а. Чтобы удалить 5-бромурацил, культуру центрифугируют или фильтруют и клетки ресуспендируют в среде, содержащей 20 мкг/мл тимина, во избежание их гибели от недостатка тимина во время дальнейшего роста и (или) процедур отбора.

Обработка 2-аминопурином

1. Клетки исследуемой бактерии выращивают в течение ночи в L-бульоне (разд. 13.9.1) или питательном бульоне (разд. 13.9.11).

2. Культуру разводят свежим бульоном, содержащим 500 мкг/мл 2-аминопурина, до плотности 10^2 — 10^3 клеток в 1 мл.

3. Проводят инкубацию на качалке до тех пор, пока культура не становится мутной. Это длительный этап, во время которого происходит рост клеток и экспрессия

индуцированных мутаций. При желании непосредственно вслед за ним можно приступить к обогащению культуры по тому или иному мутанту. Если же необходимо получить сразу много независимых мутантов, следует поделить культуру на несколько пробирок еще на этапе добавления 2-аминопурина и затем из каждой отбирать лишь один определенный мутант.

13.2.4. Соединения группы ICR

Соединения этой группы [acridine half-mustards, обозначаемые также номером с акронимом ICR, происхождение которого связано с изучением этих веществ в Институте исследований рака (Institute for Cancer Research), находящемся в Филадельфии, шт. Пенсильвания] обладают мутагенным действием, обусловленным их интеркаляцией в молекулу ДНК между основаниями, образующими пары в двойной спирали.

Интеркаляция в свою очередь приводит к вставке или делеции нуклеотидов во время последующей репликации. В результате происходят мутации сдвига рамки, при которых в транскрибируемой молекуле мРНК закодированная информация, подлежащая трансляции, имеет сдвиг в рамке считывания. При этом нарушается последовательность аминокислот за участком вставки или делеции. Обычно сдвиг рамки ведет к появлению бессмысленного кодона (нонсенс-кодона), и поэтому фенотипически мутанты в данном случае сходны с нонсенс-мутантами, образованными в результате замены оснований: в обоих случаях функция, затрагиваемая мутацией, полностью нарушается.

Методика

1. Активно растущую культуру, выбранную для обработки мутагеном, разводят до концентрации 10^4 клеток/мл минимальной средой (разд. 13.9.8), содержащей 5—10 мкг/мл ICR-191 (поставляется фирмой Polysciences, Inc., Warrington, PA 18976).

2. Выращивают культуру до концентрации клеток, для которой светорассеяние составляет 100 ед. при измерении в колориметре Клетта — Саммерсона с использованием красного светофильтра (разд. 11.4.1). Это соот-

ветствует приблизительно 10—12 циклам деления в присутствии мутагена.

3. Делают посев разведений для отбора мутантов или предварительно обогащают культуру.

Возможные трудности

Перед обработкой мутагенами группы IRC целесообразно изучить рост данной бактерии в средах с возрастающей концентрацией мутагена. Для эксперимента по мутагенезу следует выбрать такую концентрацию, при которой культура еще может медленно расти (время генерации приблизительно вдвое превышает нормальное); в этом случае наблюдается оптимальная корреляция между торможением роста и мутагенной активностью. Это предшествующее опыту определение важно при изучении бактерий с различной степенью дефектности рекомбинационной и репарационной систем, так как они могут быть слишком чувствительны к мутагену. Соединения рассматриваемой группы могут усилить индукцию мутаций светом, поэтому, если поставлена цель — получить мутации только сдвига рамки, опыты следует проводить в темноте.

13.2.5. Азотистая кислота

Азотистая кислота, относящаяся к химическим мутагенам, вызывает главным образом транзиции в обоих направлениях за счет дезаминирования цитозина и аденина. Кроме этого, по неизвестному механизму она со значительной частотой индуцирует делеции.

Методика

1. Культуру, предназначенную для мутагенеза, в течение ночи выращивают в 5 мл L-бульона (разд. 13.9.1) или питательного бульона (разд. 13.9.11). Для сбора клеток культуру центрифугируют при 5000 g 5 мин.

2. Осадок промывают 5 мл стерильного 0,1 М Na-ацетатного буфера, pH 4,6 (разд. 13.9.6).

3. Готовят свежий раствор азотистой кислоты (0,05 М нитрит натрия в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 4,6).

4. Промытые клетки ресуспендируют в 1 мл азотистой кислоты и инкубируют 10—20 мин при 30—37 °С без встряхивания.

5. Для остановки реакции добавляют 10 мл минимальной среды (разд. 13.9.8 или 13.9.15).

6. После центрифугирования суспензии при 5000 g в течение 5 мин осадок ресуспендируют в среде, пригодной для дальнейшего выращивания и выявления желаемого типа мутантов. Поскольку обработка азотистой кислотой вызывает гибель значительного числа клеток, следует определить степени выживания клеток путем посева приблизительных разведений на питательный агар (разд. 13.9.12) до и после обработки. Оптимальная степень выживания находится в пределах между 0,1 и 0,01 %.

13.2.6. Алкилирующие агенты

Алкилирующие агенты, такие, как этилметансульфонат (ЭМС), диэтилсульфат, метилметансульфонат, модифицируют в ДНК преимущественно пуриновые основания, в первую очередь гуанин. ЭМС, самый распространенный алкилирующий агент в исследованиях по мутагенезу, действует весьма специфично, вызывая в основном транзиции типа GC→AT [10, 22].

Методика

1. Выращивают культуру бактерий, предназначенную для мутагенеза, в L-бульоне (разд. 13.9.1) или питательном бульоне до поздней логарифмической фазы роста (разд. 13.9.11).

2. Смешивают равные объемы культуры и свежеприготовленного исходного раствора ЭМС [0,1 мл ЭМС в 2,5 мл минимальной среды (разд. 13.9.8 или 13.9.15), подогретой до 37 °С].

3. Смесь аэрируют на качалке 1—2 ч при 37 °С.

4. Разводят культуру в 10 раз свежей минимальной средой и дают ей возможность расти в течение несколь-

ких часов. В зависимости от того, какой тип мутанта нужно получить, либо обогащают культуры по этому мутанту, либо непосредственно высевают соответствующие разведения для выявления мутантов.

13.2.7. Агенты, излечивающие клетки от плазмид

При добавлении в среду таких веществ, как акридиновые красители, бромистый этидий, додецилсульфат натрия и новобиоцин, а также при повышении температуры из бактериальных клеток могут высвобождаться молекулы плазмидной ДНК (излечивание бактерий) [20]. Плазмидные молекулы, существующие как независимо реплицирующиеся кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК, удаляются под действием этих агентов либо из-за нарушения их репликации (вещества акридинового ряда, бромистый этидий и новобиоцин), либо в результате изменения места их прикрепления к мембране (в присутствии додецилсульфата натрия и при повышенной температуре). Поскольку плазмидная ДНК играет важную роль в качестве переносчика генетических факторов устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам, а также факторов, детерминирующих антибактериальные агенты и сложные метаболические функции, методы получения бесплазмидных штаммов вызывают большой интерес у исследователей, занимающихся генетикой бактерий.

Методика

Обычно методика излечивания клеток от плазмид заключается в следующем.

1. Из культуры исследуемого бактериального штамма, находящейся в фазе логарифмического роста, отбирают аликвоты и вносят по 10^3 — 10^4 клеток в ряд пробирок с питательным бульоном (разд. 13.9.11), L-бульоном (разд. 13.9.1) или какой-либо другой подходящей средой с излечивающим агентом в различных концентрациях.

2. Инкубируют культуры в течение ночи при обычной для данной бактерии температуре роста.

3. Выбирают культуру, в которой появляется едва заметная мутность, и высевают ее разведения на питательный агар (разд. 13.9.12) или сходную среду.

4. Проверяют отдельные колонии на потерю функций, определяемых плазмидами. Для этого высевают колонии штрихом на агар с антибиотиками (разд. 13.9.4) или наслаивают поверх колоний тонкий слой агара с индикаторным штаммом с целью выявить бактериоцины или другие внеклеточные продукты.

Следует отметить, что оптимальная концентрация агента, излечивающего бактерии от плазмид, может сильно варьировать — в 100 и даже в 1000 раз — в зависимости от того, какая бактерия подвергается обработке, а эффективность излечения зависит как от штамма, так и от агента, которым обрабатывают клетки.

Для излечения можно использовать также повышенные температуры инкубации (на 5—7 °C выше нормальной температуры роста).

1. Выращивают небольшое количество (5—10 мл) культуры исследуемого бактериального штамма в питательном бульоне (разд. 13.9.11) или другой пригодной для этого питательной среде до поздней логарифмической фазы при повышенной температуре (43 °C для штаммов, растущих нормально при 37 °C).

2. Разводят культуру в 20 раз свежей средой и продолжают выращивание при повышенной температуре. В случае необходимости этот этап повторяют.

3. Высевают соответствующие разведения культуры на питательный агар (разд. 13.9.12) или сходную среду для получения отдельных колоний.

4. Проверяют отдельные колонии на потерю функций, определяемых плазмидами, как описано в п. 4 выше.

5. Чтобы подтвердить потерю плазмид, проводят выделение и фракционирование ДНК по известным методам (метод выделения плазмидной ДНК см. в гл. 15) и убеждаются в отсутствии плазмидной ДНК в клетках излеченного штамма.

13.3. ЭКСПРЕССИЯ МУТАЦИЙ

Бактерии могут выжить, имея лишь единственную хромосому; в этом смысле они гаплоидные организмы. Однако динамика их деления и репликации хромосомы такова, что почти при любых условиях роста среднестатистическая бактериальная клетка содержит от полутора до двух полных хромосом. Поэтому в культурах, высеянных сразу же после обработки мутагеном, возникшие мутации с потенциально рецессивным фенотипом (например, связанные с ферментативной функцией) могут маскироваться присутствием неизменной хромосомы в тех клонах, в которых последняя имеется. В связи с этим целесообразно дать культуре, обработанной мутагеном, расти в течение определенного периода времени и тем самым исключить возможность одновременного присутствия в одной клетке хромосомы, содержащей новую мутацию, и прежней хромосомы. Длительность этого периода зависит как от времени деления той или иной бактерии при росте в данных условиях, так и от специфики роста. Для видов или штаммов, клетки которых при росте образуют цепочки или гроздья (например, бациллы, стрептококки, стафилококки), этот период больше, чем для штаммов, растущих в виде одиночных клеток. При излишнем затягивании выращивания мутантные клетки сами начинают делиться, и тогда в одной клетке может присутствовать несколько копий одной мутации. Если хотят получить ряд независимых мутантов одного типа, то лучше всего еще во время индукции мутаций мутагеном или сразу же после нее поделить культуру на порции и затем из каждой порции отбирать после периода выращивания только по одному мутанту. Как было отмечено ранее в описании методов мутагенеза, если время обработки мутагеном достаточно велико, то выращивание проводят одновременно с индукцией мутагеном, тем самым устраняя необходимость в проведении дальнейшего выращивания.

13.4. ОБОГАЩЕНИЕ МУТАНТНЫМИ КЛЕТКАМИ

Обычно возникновение мутаций, даже в том случае, когда их вызывают сильными мутагенами, — относительно редкое событие. В популяциях бактерий частота му-

таций может быть, например, такой низкой, как 1 мутант на 10^6 — 10^7 клеток. Выделить мутант, присутствующий на обильном фоне немутировавших клеток, может оказаться нелегко, особенно если применяются непрямые методы выявления. В таких случаях перед выделением мутанта из культуры, подвергнутой действию мутагена, вводят этап обогащения.

В самой распространенной методике обогащения используется антибиотик пенициллин [11, 18]. Когда культуру, содержащую как мутанты, так и немутировавшие клетки, выращивают на искусственной среде, в которой мутантные клетки не растут, пенициллин избирательно вызывает гибель активно делящихся немутировавших бактерий, нарушая в них процесс синтеза клеточной стенки. В оптимальных условиях можно достичь 1000-кратного обогащения мутантами по отношению к немутантам.

13.4.1. Обогащение с помощью пенициллина

1. Выращивают культуру, подвергнутую предварительному действию мутагена, до ранней логарифмической фазы роста (оптическая плотность при длине волны 600 нм — около 0,1, или 15—20 ед. при 660 нм по шкале Клетта).

2. Добавляют 10 000 ед. пенициллина G на 1 мл среды и продолжают инкубацию культуры на качалке до тех пор, пока не прекратится увеличение мутности (обычно 60—90 мин).

3. Удаляют пенициллин либо фильтрованием через стерильный мембранный фильтр (например, фильтр с диаметром пор 0,45 мкм), либо инактивацией его пенициллиназой. Последний вариант применяют для бактерий, которые при фильтровании резко уменьшают пропускную способность фильтра. Обычно добавляют 100 ед. пенициллиназы на 1 мл и инкубируют 30 мин при температуре выращивания.

4. После центрифугирования при 5000 g в течение 5 мин или фильтрования (см. выше) один раз отмывают клетки свежей культуральной средой и вновь суспендируют их в ней перед проведением этапа отбора или поиска.

13.4.2. Обогащение с помощью циклосерина

Показано, что помимо пенициллина эффективным препаратом, способствующим обогащению культуры спонтанно возникающими мутантами у различных видов рода *Pseudomonas*, является аминокислотный аналог — D-циклосерин [21]. При добавлении его в количестве 100 мкг/мл в сочетании с пенициллином к растущей культуре *Pseudomonas putida* он вызывает селективный лизис немутировавших клеток. При этом в течение 1—2 ч культура обогащается мутантами в 100—1000 раз. Преимущество двойной обработки перед использованием только пенициллина или только циклосерина заключается в том, что в первом случае не выживают спонтанные мутанты, которые устойчивы к каждому из антибиотиков по отдельности. Проведя несколько последовательных циклов обогащения двойной обработкой, можно увеличить относительное содержание в популяции мутантных клеток до значения 10^6 и выше и тем самым получить реальную возможность выделить мутант, возникающий с очень низкой частотой.

13.5. ПРЯМОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАНТОВ

Мутанты, которые приобрели какую-либо активность, отсутствующую у немутировавших клеток, могут быть выявлены прямым отбором на соответствующей среде. К таким мутантам относятся клетки, ставшие устойчивыми к различным антибиотикам, бактериофагам или химическим ингибиторам, обладающим в норме бактерицидным или бактериостатическим действием по отношению к немутировавшим родительским формам. Прямым отбором могут быть выделены также мутанты, способные к утилизации нетрадиционных источников углерода или азота. Благодаря высокой разрешающей способности прямого отбора (т. е. способности выявлять немногочисленные мутантные клетки на обильном фоне немутировавших клеток) при его использовании обычно не возникает необходимости в каких-либо приемах по обогащению культуры мутантами. К тому же, поскольку типы генетических функций, подлежащие прямому отбору, ожидаются как доминантные по отношению к их

нормальным аналогам в клетках, имеющих более чем одну хромосому, как правило, нет нужды в дополнительном подращивании культуры, подвергнутой действию мутагена, перед высевом на селективную среду.

Одна из основных трудностей при прямом отборе состоит в выборе оптимальной концентрации селективного агента. Например, при отборе мутантов, устойчивых к различным антибиотикам, важно подобрать такую концентрацию антибиотика, которая полностью блокировала бы рост бактерий дикого типа, но в то же время позволяла бы развиваться устойчивым мутантам. Определение оптимальной концентрации методом проб и ошибок может потребовать много времени и сил. В первом примере, приведенном ниже, описан простой метод создания градиента концентрации какого-либо агента в чашке, который можно модифицировать для выявления различных типов мутантов, упоминавшихся выше. Во втором примере описывается простой метод бумажных дисков, используемый для индукции и прямого отбора ревертантов ауксотрофных мутантов.

13.5.1. Устойчивость к антибиотикам

Мутанты, устойчивые к антибиотикам, выделить довольно легко, а сами значения устойчивости могут служить удобными генетическими маркерами, характеризующими бактериальный штамм. В данном примере описывается метод получения спонтанно возникающих мутантов [24].

Приготовление градиентного агара в чашках

1. В стерильные чашки Петри диаметром 100 мм наливают по 10 мл автоклавированного питательного агара (разд. 13.9.12) и оставляют его остывать при таком наклоне чашек, чтобы получался скошенный агар (рис. 13.1).

2. После того как агар застывает, чашки ставят горизонтально и наливают в каждую еще по 10 мл агара с одним из антибиотиков (разд. 13.9.14): сульфатом стрептомицина (100 мкг/мл), пенициллином (500 мкг/мл) или рифампином (50 мкг/мл).

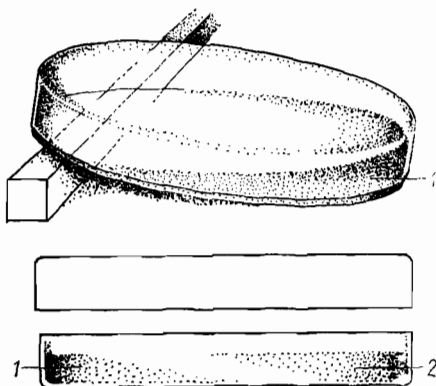


Рис. 13.1. Приготовление агара в чашках для выделения мутантов, устойчивых к антибиотикам. Вверху — первый этап; внизу — второй этап. 1 — питательный агар, 2 — агар с антибиотиком. В результате получается градиент концентрации антибиотика, возрастающий от низких значений у левого края чашки до высоких значений у правого края.

3. Агару второго слоя дают возможность остыть на горизонтально выставленном столике. В результате формируется градиент концентрации антибиотика от 0 мкг/мл на одном из краев чашки до максимальной концентрации (50—500 мкг/мл) на противоположном.

4. Отмечают края с указанием направления градиента. Чашки с агаром готовят не позднее чем за 24 ч до использования, чтобы успел сформироваться градиент концентрации антибиотика.

Метод выделения мутанта

1. Выращивают культуру интересующего прототрофного штамма, выделенного из отдельной колонии, до середины логарифмической фазы роста в L-бульоне (разд. 13.9.1) или питательном бульоне (разд. 13.9.11).

2. Равномерно распределяют образцы культуры объемом 0,1 мл каждый по поверхности агара в чашках с градиентами антибиотика (разд. 13.9.14).

3. Инкубируют чашки в течение 24—36 ч.

4. Отбирают устойчивые к антибиотику колонии стерильной петлей и высевает штрихом на вторую градиентную чашку в направлении возрастания концентрации антибиотика с целью определить их приблизительный уровень устойчивости.

5. После второй инкубации отбирают отдельные колонии и испытывают в чашках с тем или иным антибио-

тиком в отсутствие градиента (разд. 13.9.14). Антибиотики добавляют в разной концентрации, чтобы по полученным результатам можно было оценить устойчивость к ним бактерий. В том случае, если нужна высокая степень устойчивости к антибиотику, штаммы, полученные после первого цикла отбора, можно вновь нанести в чашки с агаром, имеющим в 5—10 раз более крутой градиент концентрации антибиотика, и затем провести процедуры, как описано выше.

13.5.2. Анализ обратных мутаций (метод бумажных дисков)

Прямой отбор широко используется для получения ревертантов (бактерий с обратными мутациями) ауксотрофных мутантов. *Ауксотрофы* представляют особый класс условно летальных мутантов, не способных выживать без искусственной поддержки извне в виде добавления какого-нибудь соединения — участника обмена веществ (например, аминокислоты, витамина), которое они сами не в состоянии синтезировать. Если ауксотроф возник в результате мутации, связанной с заменой оснований, его можно «ревертировать» (вызвать обратную мутацию, возвращающую к исходному типу) воздействием соответствующего мутагена. Помимо «истинных ревертантов» может возникать множество «фенотипических ревертантов», которые своим появлением обязаны мутациям в локусах, отличных от тех, которые ответственны за первоначальную мутацию. Например, мутанты со сдвигом рамки часто могут ревертировать за счет вторичной компенсаторной мутации со сдвигом рамки, расположенной вблизи локуса первой мутации и восстанавливающей правильное считывание триплетов. Некоторые мутанты с заменой оснований могут ревертировать под действием вторичной мутации, происходящей в другом месте мутировавшего гена. Предполагается, что при этом вторичная мутация частично компенсирует первоначальную мутацию посредством взаимодействия аминокислот, кодируемых мутировавшими локусами гена и расположенных в двух измененных областях белковой молекулы. Мутанты с заменой оснований, в особенности

нонсенс-мутанты, могут также «ревертировать» за счет супрессорных мутаций в различных генах, кодирующих синтез тРНК. Благодаря этим супрессорным мутациям становится возможной трансляция измененной молекулой тРНК бессмысленного кодона в гене, кодирующем белок. Этим, хотя бы частично, исправляется первоначальная мутация. Во всех этих случаях «ревертанты» можно получить прямым отбором, просто высевая большое количество исходного мутантного штамма на среду без того метаболита, в котором данный штамм нуждается. Помимо очень большой чувствительности этого метода, который позволяет выявлять единственную бактерию с обратной мутацией на 10^8 — 10^9 мутантных клеток, подобного рода анализ предоставляет значительную информацию о природе исходной мутации. Сравнивая эффективность, с которыми различные мутагены обращают какую-либо мутацию, часто можно судить о том, что лежит в ее основе — транзиция или трансверсия, вставка или делеция оснований (сдвиг рамки). Способность мутации обращаться под действием любого мутагена считается свидетельством того, что эта мутация точечная, а не результат делеции, инверсии или другого типа хромосомных аберраций.

Методика, приводимая ниже, предназначена для выявления роста частоты обратных мутаций под действием нескольких часто используемых химических мутагенов. Эта методика с использованием дисков из фильтровальной бумаги, пропитанных соответствующими веществами [6, 9], позволяет исследовать на мутагенную активность не только аналоги оснований и гидроксилламин, но и алкилирующие агенты (ЭМС), соединения группы ICR (ICR-191), вызывающие преимущественно вставки и делеции пар оснований (сдвиги рамки), и НТГ, сходный по специфичности с ЭМС.

На практике отбирают несколько ауксотрофных штаммов интересующей исследователя бактерии, например штаммов, нуждающихся для своего роста в определенных аминокислотах. Обычно используют серию мутантов, выделенных после обработки различными мутагенами, и сравнивают их способность к реверсии.

Методика

1. Выращивают культуру каждого из исследуемых ауксотрофных штаммов до поздней логарифмической фазы роста (с концентрацией около 10^9 клеток/мл) в 5 мл L-бульона (разд. 13.9.1) или питательного бульона (разд. 13.9.11) при 37°C.

2. Среду центрифугируют и клетки ресуспендируют в равном объеме минимальной среды M56 (разд. 13.9.8) или минимального бульона Дэвиса (разд. 13.9.15).

3. Наносят аликвоты получившихся суспензий на минимальный агар (разд. 13.9.10), разлитый достаточно толстым слоем (30 мл на чашку).

4. После того как поверхность подсохнет, стерильным пинцетом равномерно располагают на ней 6 дисков из фильтровальной бумаги диаметром 1 см.

5. Наносят на поверхность каждого диска каплю (приблизительно 50 мкл) одного из следующих растворов: стерильная вода (контроль), 5-бромурацил (8 мкг/мл), ICR-191 (1 мг/мл), НТГ (1 мг/мл), гидроксиламин (17 мг/мл) и неразведенный ЭМС.

6. Инкубируют чашки в положении крышкой вверх в течение 4—5 сут при 37°C, пока выросшие колонии не становятся легко различимыми. О вызванных мутагеном обратных мутациях можно судить по кольцам роста колоний вокруг дисков; непосредственно вблизи дисков колоний обычно не наблюдается из-за летального действия мутагенов. По полученной картине, зная преимущественную мутагенную специфичность взятых в опыт соединений, можно определить природу исходных мутаций.

*Изучение свойств бактерий,
претерпевших обратные мутации*

Описываемый полуколичественный анализ может применяться для того, чтобы отличать полных ревертантов (имеющих первоначальный генотип и фенотип) и от частичных ревертантов, и от штаммов, содержащих не сцепленные супрессоры. Два последних класса характеризуются сильно замедленным ростом в отсутствие добавки соответствующего питательного вещества. Из

чашки, в которой ставилась проба с бумажными дисками, отбирают колонии разных размеров, наносят их штрихами на минимальный агар для очистки от посторонних мутантов, выращивают в питательном бульоне или делают посев соответствующих разведений на минимальный агар. После 2—3 сут инкубации при 37°C определяют относительные размеры колоний. Частичные ревертанты и супрессированные штаммы, как правило, имеют колонии значительно меньших размеров.

В некоторых системах полные ревертанты можно отличить от двух других классов по чувствительности к тому или иному ингибитору обмена веществ, такому, например, как аналог, ингибирующий рост подавлением синтеза мРНК, кодирующей синтез ферментов. Так, для системы биосинтеза триптофана в качестве аналога, обладающего таким эффектом, может служить 5-метилтриптофан. При низких концентрациях этот ингибитор не тормозит синтез триптофана у полных ревертантов, однако практически полностью прекращает его в штаммах, которые синтезируют триптофан в ограниченных количествах. Чтобы показать это, наносят по 10^6 — 10^7 клеток исследуемых штаммов на минимальный агар в чашки (разд. 13.9.10 или 13.9.15). Так же как в случае пробы на обратные мутации, наносят каплю раствора 5-метилтриптофана (1 мкг/мл) на стерильный диск фильтровальной бумаги. Зона торможения роста вокруг диска бумаги будет значительно больше для частичных ревертантов и супрессированных штаммов, чем для полных ревертантов. Можно также нанести клетки разных штаммов с обратными мутациями прямо в чашки на минимальный агар, содержащий 5-метилтриптофан (0,01 мкг/мл), и сравнить скорости их роста с наблюдаемыми на минимальном агаре без аналога.

Более трудоемкий и требующий больших затрат времени метод различения полных и частичных ревертантов и супрессированных штаммов включает изучение активностей ферментов в рамках тех биохимических функций, которые затрагиваются соответствующей мутацией. Если такую функцию нетрудно проверить, можно сравнить количество и стабильность фермента у различных ревертантов и бактерий дикого типа. Подобного рода анализ, однако, может привести к неправильным выводам из-за

существования регуляторных воздействий мутаций в структурных генах на количественный уровень синтезируемых в клетке ферментов. Например, в случае триптофановой или других репрессируемых ферментных систем дерепрессия в отношении деятельности ферментов системы более выражена у частичных ревертантов и супрессированных штаммов, чем у клеток дикого типа, так как конечный продукт у первых синтезируется в ограниченных количествах, что приводит к своего рода голоданию клетки. Тот или иной фермент в клетках с частично обращенной мутацией может иметь очень низкую удельную активность, но его фактическое количество (по отношению к общему белку клетки) может в результате дерепрессии стать в несколько раз больше, чем у дикого типа (см., например, работы [6, 9]).

13.6. НЕПРЯМОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИИ

Большинство мутантных типов нельзя выявить методами прямого отбора, описанными в предыдущем разделе. Для любой мутации, связанной с потерей генетической функции, требуются такие методы выявления, которые позволили бы идентифицировать очень редко возникающий тип мутанта на большом фоне немутантных клеток. В эту группу входят ауксотрофные мутанты, мутанты с изменениями в системе сбраживания углеводов, морфологические варианты различных типов и другие условно летальные мутанты.

Самыми распространенными методами непрямого выявления таких мутантов являются случайный поиск соответствующих колоний и метод перепечатывания колоний с одной чашки на другую (метод отпечатков). Оба метода требуют проверки большого числа бактериальных колоний. По существу, эти методы отличаются только способом осуществления этой проверки. В методе случайного поиска одновременно со среды на среду переносится одна колония — пока не обнаружится вызванное мутацией нарушение. Это утомительная и требующая больших затрат времени процедура. Поэтому иногда такой метод называют подходом «в лоб». Один из способов повышения вероятности выявления нужного мутанта «в лоб» этим методом — использование в каче-

стве компонента среды, на которую делают посев, подходящего меняющего цвет субстрата. В одном из примеров такого подхода, который приводится ниже, мутанты, не способные сбраживать лактозу, выявляют благодаря включению в среду красителя тетразолия [15].

13.6.1. Мутанты по системе брожения

1. Выращивают посевной материал соответствующей сбраживающей лактозу бактерии в L-бульоне (разд. 13.9.1) или питательном бульоне (разд. 13.9.11).

2. Подвергают культуру действию мутагена и затем дополнительно выращивают ее, как описано в разд. 13.3.

3. Определяют плотность клеток в культуре с помощью колориметра Клетта — Саммерсона или какого-нибудь другого прибора для измерения мутности. Делают посев соответствующих разведений в чашки с лактозо-тетразолиевым агаром (разд. 13.9.3) с таким расчетом, чтобы получить 50—100 колоний на чашку.

4. Инкубируют до тех пор, пока колонии не достигают в диаметре 2—3 мм. Колонии родительского положительного по сбраживанию лактозы штамма имеют белый цвет, тогда как колонии отрицательные по сбраживанию лактозы ярко-красные. В основе этого различия в окраске лежит выделение кислоты бактериями, сбраживающими лактозу. В слабо забуференной среде выделяющаяся при брожении кислота снижает значение рН и предотвращает восстановление красителя. В то же время колонии клеток, не сбраживающих лактозу, сохраняют присущую им способность восстанавливать тетразолий до его окрашенной в красный цвет формы.

Возможные трудности

Важно, чтобы колонии на чашках не были посеяны слишком часто, так как выделение кислоты бактериями в колониях дикого типа может препятствовать восстановлению тетразолия и отрицательными по сбраживанию лактозы колониями. Разведения должны быть подобраны с таким расчетом, чтобы на чашку приходилось не более 100 колоний. Важно также, чтобы лактоза была высококачественная, без примеси глюкозы; иначе

результаты могут быть искажены слабым сбраживанием глюкозы, что часто случается при использовании лактозы, содержащей примесь глюкозы (см. список реактивов в разд. 13.10.2).

Эта общая тактика поиска применима для любого мутанта, для которого удастся найти подходящий субстрат, позволяющий благодаря изменению окраски различать колонии мутантов. В качестве примеров можно указать на применение *p*-нитрофенилфосфата для выявления фосфатазных мутантов, красителя Гимзы или метилового зеленого для выявления мутантов по нуклеазам и диазотированных производных казеина, коллагена или альбумина для выявления мутантов по протеолитическим ферментам. Солюбилизация желатины (которая сама по себе не является цветовым индикатором), сопровождающаяся переходом из опалесцирующей формы в прозрачную, уже давно используется для измерения протеолитической активности. Подобным образом нуклеазную активность можно выявлять по солюбилизации РНК и ДНК, включенных в агар в виде кислотонерастворимых компонентов.

13.6.2. Выявление ауксотрофов (метод отпечатков)

В 1952 г. Ледерберг и Ледерберг [17] разработали для непрямого отбора бактериальных мутантов метод отпечатков с чашки на чашку.

Этот метод, схема которого изображена на рис. 13.2, позволяет с помощью кусочка бархата (разд. 13.9.16) в один прием переносить большое число колоний с одной твердой среды на другую. Более того, при этом во второй чашке колонии располагаются точно так же, как в первой. Это позволяет быстро проверять большое число индивидуальных колоний на наличие мутантных признаков. Сначала на неселективную полную среду высевают нужное разведение той культуры, которую подвергли действию мутагена. Затем выросшие колонии «перепечатывают» на селективную или минимальную среду. Колонии, которые растут на среде с соответствующей добавкой и не растут на минимальной среде, отбирают и проверяют на наличие мутаций. Пользуясь этим мето-

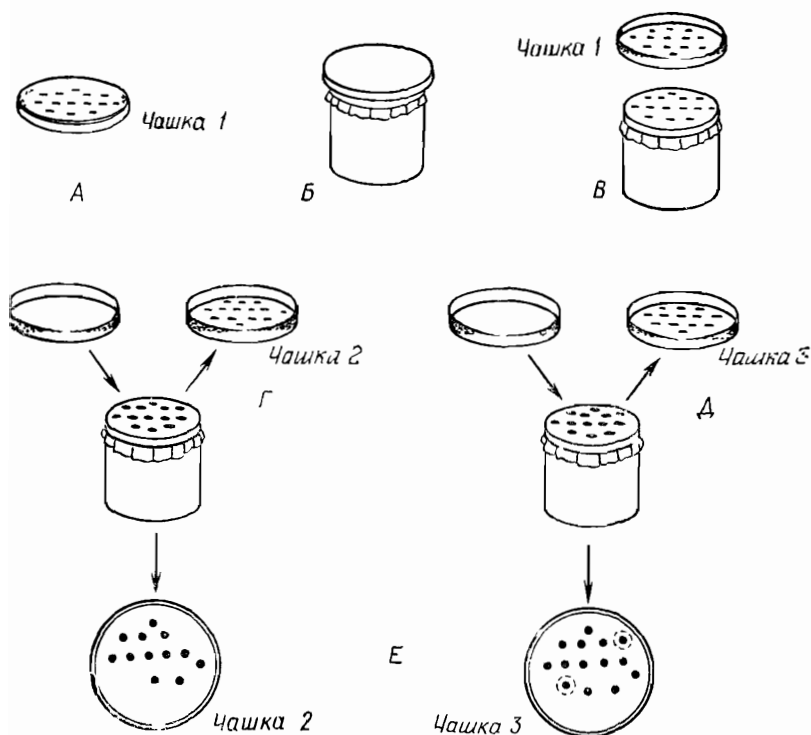


Рис. 13.2. Метод перепечатывания колоний с чашки на чашку (метод отпечатков), предназначенный для отбора ауксотрофных мутантов исследуемого штамма. А. Колонии в исходной чашке, выращенные на полной среде (чашка 1). Б, В. Перепечатывание колоний на бархат с исходной чашки (чашки 1). Г. Отпечаток колоний с бархата на агар в чашке с минимальной средой (чашке 2). Д. Отпечаток колоний с бархата на агар в чашке с полной средой (чашке 3). Е. По истечении определенного срока сравнивают рост колоний в чашках 2 и 3 для выявления колоний ауксотрофных мутантов.

дом, за короткое время можно проверить несколько тысяч колоний, при этом не нужно отбирать и перевивать каждую колонию по отдельности. Метод отпечатков особенно полезен для выделения ауксотрофов, которые растут на полной среде, но не растут на минимальной. Добавляя к минимальной среде, на которую переносят колонии, определенные вещества, можно выявить ауксо-

трофы определенного типа (например, по одной аминокислоте, витамину, предшественнику нуклеиновой кислоты). Если применять высокоэффективный мутаген, такой, как НТГ, этим методом можно получить до 20% ауксотрофов от общего числа клеток или 1—2% мутантов определенного типа. Данный подход иллюстрирует приведенный ниже пример выделения ауксотрофных мутантов различных типов. См. также разд. 20.2.5.

Методика

1. Исследуемую бактерию подвергают действию мутагенного фактора, желателно широкого спектра действия (например, ультрафиолета).

2. Выращивают обработанные клетки в питательном бульоне (разд. 13.9.11), чтобы выявить возникшие мутации. Если нужно получить ряд независимых мутаций, следует перед выращиванием поделить культуру на несколько порций.

3. Высевают необходимые разведения в чашки с питательным агаром (разд. 13.9.12) и инкубируют чашки вверх дном при 37 °С.

4. По достижении колониями размера около 3 мм в диаметре «перепечатавают» их в чашки с минимальным агаром (разд. 13.9.10 или 13.9.15) и питательным агаром (разд. 13.9.12). Когда колонии вырастают, выявляют те из них, которые есть на питательном агаре, но отсутствуют на минимальном агаре.

На этой стадии (последней из отраженных схемой на рис. 13.2) методика позволяет выявить лишь всю совокупность ауксотрофов; пока нельзя ответить на вопрос, какие именно изменения произошли в тех или иных конкретных звеньях обмена веществ ауксотрофов. Чтобы идентифицировать различные типы ауксотрофов, выполняют следующие дополнительные этапы.

5. Отбирают выявленные колонии ауксотрофов с помощью стерильных зубочисток, размазывают массу клеток пятнами размером 0,6 см в диаметре каждое в чашках с питательным агаром (разд. 13.9.12) и инкубируют при 37 °С. В каждой чашке должно находиться по 40—50 пятен.

6. «Перепечатаывают» клоны, выросшие из пятен, на минимальный агар (разд. 13.9.10 или 13.9.15) с добавками метаболитов в девяти различных комбинациях (табл. 13.3) и без добавок.

7. Определяют, при наличии каких наборов метаболитов растет обнаруженный мутант. Эти данные дают возможность сделать вывод о природе нарушения, вызванного мутацией. Например, мутант, который растет при добавлении 3-го и 6-го наборов, относится, по всей вероятности, к цистеинзависимым мутантам, а 5-го и 9-го наборов — к аргининовым ауксотрофам. Затем, чтобы убедиться в правильности предварительных выводов, проверяют рост каждого клона на минимальном агаре с той добавкой, от которой, как предполагают, зависит данный ауксотроф.

Возможные трудности

Некоторые ауксотрофы отвечают только на одну комбинацию добавок или вообще не отвечают ни на одну из них. Первый случай может быть обусловлен следующими факторами: 1) двумя независимыми мутациями, приводящими к потребностям в разных питательных веществах, которые могут находиться в одном наборе метаболитов; 2) мутацией, затрагивающей один из первых этапов разветвляющегося метаболического пути (например, штамм с дефектом синтеза полиароматических кислот растет только на среде с добавлением 8-го набора); 3) эффектами ингибирования другими метаболитами набора. Мутанты, которые вообще не растут при добавлении любого набора метаболитов, могут быть 1) мутантами, нуждающимися в таком веществе (например, витамине), которое не вошло ни в один из наборов, или 2) двойными мутантами, зависящими от сочетания двух метаболитов, не вошедших ни в один из наборов. Такие мутанты можно проверить на чашках с добавлением смеси витаминов, или гидролизатов РНК, или полной смеси аминокислот (например, кислотного гидролизата казеина, или казаминовых кислот, с L-триптофаном). Если выделяют ауксотрофы, которые не отвечают ни на один из предлагаемых наборов, можно попробовать другие добавки, такие, как смеси витаминов, аминокислот или гидролизаты нуклеиновых кислот [16].

13.7. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МУТАНТОВ

Когда мутант наконец выделен, часто желательно провести биохимические и генетические исследования, чтобы иметь информацию о природе его генетического дефекта. Например, потребность в питательном веществе может быть вызвана мутациями в нескольких генах. Так, ауксотрофы, не способные синтезировать опреде-

Таблица 13.3. Комбинации добавок к минимальному агару^а

Номер набора	1	2	3	4	5
6	Аденин	Гуанин	Цистеин	Метионин	Витамин В,
7	Гистидин	Лейцин	Изолейцин	Валин	Лизин
8	Фенилаланин	Тирозин	Триптофан	Треонин	Пролин
9	Глутаминовая кислота	Серин	Аланин	Аспарагиновая кислота	Аргинин

^а Все вещества, кроме витамина В₁, добавляют в конечной концентрации 20 мкг/мл, витамин В₁ — в конечной концентрации 4 мкг/мл.

ленную аминокислоту, могут иметь нарушения в одной из нескольких последовательных ферментативных реакций, ведущих к синтезу этой аминокислоты. Морфологические мутанты или мутанты с изменениями в синтезе макромолекул могут иметь модификации в еще более широком классе функций, например на этапе сборки или регуляции.

Хотя в задачу настоящей главы не входит детальное описание множества возможных подходов к изучению природы мутантов, ниже приводится несколько основных способов анализа, которые могут быть полезны в работе.

13.7.1. Природа изменений ДНК

Некоторые представления о природе изменений ДНК часто можно получить с помощью анализа обратных мутаций, описанного в разд. 13.5.2. Если обратная мутация вызывается любым мутагеном, можно заключить, что это точковая мутация, а не делеция или другая хро-

мосомная аберрация. Если обратная мутация ускоряется аналогами оснований, ЭМС или гидроксиламином, возможен предварительный вывод о замене оснований, вероятно, по типу транзиции. Если же скорость обратной мутации возрастает под действием такого мутагена, как ICR-191, то скорее всего мутация представляет собой сдвиг рамки. Ускорение обратной мутации такими факторами, как ультрафиолет, при отсутствии эффекта других мутагенов указывает на мутацию по типу трансверсии (см. предупреждение в разд. 13.2). Частота спонтанной реверсии — также важный параметр, так как он является мерой генетической стабильности мутации. Это свойство может быть важным критерием в оценке пригодности данной мутации для последующих физиологических или биохимических исследований.

13.7.2. Полнота генетического блока

Второй критерий, определяющий ценность отдельной мутации — это степень инактивации гена, в котором произошла мутация. Частичное сохранение функции часто встречается в случае мутации с заменой оснований и значительно реже при сдвигах рамки или делециях. Степень полноты мутации легко оценить по скорости роста или другим проявлениям свойств, высевая клетки мутанта с низкой плотностью на селективную или непермисивную среду. Неполнота мутации может стать проблемой в работе с мутантами, которые должны использоваться в других физиологических экспериментах, связанных, например, с исследованием активности ферментов, или в сопряженных с другими мутантами тест-системах.

13.7.3. Физиологические механизмы генетического блока

Для мутантов, дефектных по одному из нескольких генов, которые кодируют ферменты, участвующие в одной цепи биохимических реакций, природу дефекта часто можно выяснить, сопоставляя зависимость роста от тех или иных факторов с накоплением промежуточных продуктов. В идеальном случае для любой последовательности биохимических реакций $X \xrightarrow{1} A \xrightarrow{2} B \xrightarrow{3} C \xrightarrow{n} КП$

(Х, А, В, С — промежуточные продукты, КП — конечный продукт) мутанты, заблокированные на любом из этапов, должны отвечать (т. е. расти) на любой способный прориффундировать в клетку промежуточный продукт реакции, образующийся за местом блока. При этом промежуточные продукты, образующиеся непосредственно перед местом блока, будут накапливаться в ростовой среде. Так, для приведенной гипотетической последовательности мутант по гену, кодирующему фермент 1, будет накапливать промежуточный продукт Х и расти при добавлении продуктов А, В или С, не говоря уже о КП. Мутант, дефектный по ферменту 2, будет накапливать промежуточный продукт А (и, возможно, Х) и расти при добавлении В, С или КП.

На практике изучение природы мутантов по накоплению продуктов и по выявлению зависимости роста от добавок ограничено несколькими факторами. Во-первых, многие продукты не могут проникнуть в клетку. Обычно, например, клеткам недоступны фосфорилированные промежуточные продукты, которые, таким образом, не могут использоваться для нормализации роста путем добавления к среде (обычно они синтезируются внутри клетки). Во-вторых, некоторые промежуточные продукты химически нестабильны и быстро деградируют до других соединений, некоторые метаболизируются другими ферментными системами. В-третьих, нужные промежуточные продукты иногда малодоступны или отсутствуют простые методы их выявления (например, невозможно колориметрическое определение и др.). Несмотря на указанные ограничения, исследование зависимости роста от добавления промежуточного продукта и накопления соответствующего продукта может оказаться чрезвычайно полезным при идентификации различных генетических и ферментативных функций в биосинтезе аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований и витаминов.

13.8. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

Индукция мутаций и выделение мутантов — важные этапы, лежащие в основе использования мутантов тем или иным способом. В последние годы широкое распро-

странение и значение приобрели две специальные разновидности применения мутагенеза. Это метод локального мутагенеза, позволяющий специфично получать мутации в ограниченном участке бактериального генома, и проба на мутагенез по Эймсу, при помощи которой можно выявить потенциальную канцерогенную активность неизвестного вещества, измерив его мутагенность в бактериальной тест-системе.

13.8.1. Локальный мутагенез

Метод локального мутагенеза, предложенный в 1971 г. Хонгом и Эймсом [13], позволяет выделять мутанты с вновь индуцированными мутациями, локализованными в небольшой области бактериальной хромосомы. Мутации индуцируются в коротком отрезке ДНК бактерии, который содержится в трансдуцирующем бактериофаге, и затем обнаруживаются в клетках, подвергшихся трансдукции, отбором по близко сцепленному маркеру. Таким способом можно селективно получать мутации в области, составляющей около 1% бактериальной хромосомы.

В приводимом ниже описании метода осуществляющий общую трансдукцию фаг P1 *E. coli* подвергают мутагенезу обработкой гидроксиламином, химическим агентом, который производит транзиции типа GC→AT. После этого фаг используют для трансдукции реципиентного штамма, имеющего генетический дефект на одном из ранних этапов биосинтеза ароматических аминокислот (*aroE*). Трансдуктанты проверяются затем на наличие новых мутаций либо в одном из близко расположенных генов устойчивости к лекарственным препаратам (стрептомицин или спектиномицин), либо в различных генах рибосомных белков. Последние мутации легко выявляются как температурочувствительные условно летальные мутации [14].

Метод приготовления трансдуцирующего бактериофага

1. Смешивают около 10^6 частиц фага P1 *vir* с 0,5 мл культуры ($1-2 \cdot 10^8$ клетка/мл) дикого штамма *E. coli* (*aroE*⁺), находящегося в середине логарифмической

фазы роста в L-бульоне (разд. 13.9.1). Это делают в пробирке, куда предварительно вносят 3 мл расплавленного и остуженного LC-агара (разд. 13.9.17), используемого затем для формирования верхнего слоя среды в чашке.

2. Выливают смесь на поверхность свежеприготовленного нижнего слоя LC-агара (разд. 13.9.18) в чашки и инкубируют в течение ночи при 37 °С.

3. Снимают верхний слой агара стерильной лопаточкой в пробирку с завинчивающейся крышкой, содержащей 0,5 мл хлороформа.

4. Промывают поверхность оставшегося в чашке агара 2 мл L-бульона (разд. 13.9.1), добавляют смыв к собранному в пробирку агару и интенсивно встряхивают.

5. Смесь центрифугируют при 5000—6000 g на настольной центрифуге в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляют пастеровской пипеткой и переносят в стерильную пробирку с несколькими каплями хлороформа.

Метод титрования и мутагенеза трансдуцирующего фага

1. Выращивают культуру *E. coli* AB1157 до приблизительной концентрации $2 \cdot 10^8$ клетка/мл в L-бульоне (разд. 13.9.1), центрифугируют и ресуспендируют полученные клетки в половине объема L-бульона.

2. Смешивают 0,1 мл этой клеточной суспензии с 0,1 мл разных разведений фаголизата (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) в L-бульоне. Для обеспечения адсорбции фага инкубируют пробы 20 мин при 37 °С.

3. Добавляют 1,5 мл расплавленного LC-агара (разд. 13.9.17), охлажденного до температуры 55 °С, смешивают быстрым вращением пробирки между ладонями и выливают в чашки на поверхность свежеприготовленного и застывшего нижнего слоя LC-агара (разд. 13.9.18).

4. Инкубируют чашки в течение ночи при 37 °С и на следующий день подсчитывают число стерильных пятен.

5. Концентрируют фаг, находящийся в лизате, центрифугированием при 48 000 g в течение 3 ч.

6. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в небольшом объеме L-бульона и оставляют на ночь при 4°C.

7. На следующий день суспензию центрифугируют при 15 000 g в течение 10 мин и осадок удаляют.

8. Вновь титруют раствор с фагом, как это было сделано ранее на этапах с 2-го по 4-й.

9. Концентрированную суспензию с фагом (10^{11} пятнообразующих единиц в 1 мл) разводят в 10 раз раствором, содержащим 0,45 M гидроксилламин, 2 mM ЭДТА, 10 mM CaCl_2 , и инкубируют 10—14 ч при 37°C.

10. Смесь центрифугируют при 48 000 g в течение 1 ч для осаждения фага. Осторожно ресуспендируют осадок в 0,1 объема L-бульона, содержащего 2 mM ЭДТА и 10 mM CaCl_2 .

11. Для удаления загрязнений суспензию центрифугируют при 15 000 g в течение 10 мин и отделяют от осадка надосадочную жидкость, в которой содержится бактериофаг. В условиях опыта жизнеспособность фага снижается примерно на 4 порядка.

12. Вновь титруют фаг, как описано выше.

Осуществление трансдукции

1. Для осуществления трансдукции [25] выращивают реципиентный штамм (*E. coli* AB2834 *aroE*) в L-бульоне (разд. 13.9.1) при 37°C до конечной концентрации $\sim 1 \cdot 10^8$ клетка/мл.

2. Клетки осаждают центрифугированием суспензии при 6000 g и ресуспендируют их в 0,1 объема L-бульона.

3. Смешивают 0,5 мл суспензии бактериальных клеток ($\sim 5 \cdot 10^8$ клеток), 0,5 мл суспензии исходного подвергнутого мутагенезу фага ($\sim 5 \cdot 10^7$ пятнообразующих единиц в 1 мл) и 0,5 мл раствора 0,015 M CaCl_2 и 0,03 M MgSO_4 .

4. Смесь инкубируют при 37°C в течение 20 мин, центрифугируют ее и дважды промывают клетки буфером M56/2 (разд. 13.9.9).

5. Ресуспендируют клетки в 1 мл буфера M56/2 и вносят аликвоты объемом 0,2 мл в чашки с минимальным агаром (разд. 13.9.10), содержащим 0,2% глюкозы и 0,3% казаминовых кислот, очищенных от примесей

окрашивающих веществ. (Смешивают 3 г Norit A с 20 г казаминовых кислот, не содержащих витаминов, в 200 мл воды. Частицы активированного угля удаляют фильтрацией под вакуумом. Процедуру повторяют дважды со свежим Norit A. Таким образом получают 10%-ный обесцвеченный раствор казаминовых кислот.)

6. Инкубируют чашки около 18 ч при 30°C или до тех пор, пока колонии трансдуцированных бактерий не станут видны невооруженным глазом.

7. Методом отпечатков переносят колонии в чашки со спектиномицином или стрептомицином (разд. 13.9.19) и в чашки с минимальным агаром (разд. 13.9.10), содержащим 0,3% казаминовых кислот.

8. Чашки с минимальным агаром инкубируют при 44°C, а чашки с антибиотиками при 30°C. После инкубации исходных чашек и чашек-копий при соответствующих температурах в течение еще 24 ч чашки совмещают для выявления колоний, устойчивых к антибиотикам, и колоний, не способных расти при 44°C.

9. Отбирают отмеченные колонии из исходных чашек, очищают клоны выделением из единичной колонии и вновь проверяют на наличие различных селективных свойств.

Возможные трудности

Фаг P1 образует очень маленькие стерильные пятна, которые трудно различить в старых чашках. Чтобы свести к минимуму эту проблему, используют только толстый слой агара (30—35 мл), залитого в чашки не ранее чем за 8—12 ч до использования. Пятна диаметром больше 1 мм наверняка относятся к примесям (обычно фаг T1). Из лизата на одной чашке обычно имеют от $1 \cdot 10^{10}$ до $5 \cdot 10^{10}$ фаговых частиц. Достаточное для эксперимента по локальному мутагенезу количество бактериофага P1 получают с 20—30 чашек.

В норме трансдукция с использованием 10^7 фаговых частиц P1 дает от 200 до 2000 трансдуктантов. Метод отпечатков может быть применен, если число трансдуктантов составляет менее чем 300 на чашку. Поэтому для определения соответствующего количества посевного материала рекомендуется провести пробный экспери-

мент. Чтобы обеспечить выделение как устойчивых к антибиотикам, так и условно летальных мутантов, следует проанализировать всего приблизительно 5000—10 000 колоний трансдуцированных бактерий.

13.8.2. Мутагенность канцерогенов (тест Эймса)

Химические канцерогены — это вещества, с большой вероятностью вызывающие образование опухолей у лабораторных животных. Эймс и соавторы [7, 8] показали, что большинство известных канцерогенов одновременно являются и мощными мутагенами. Способ проверки, разработанный ими, включает простой посев, позволяющий оценить индукцию обратных мутаций в бактериальных генах канцерогенами. Многие канцерогены, прежде чем проявить свое канцерогенное и мутагенное действие, должны быть активированы; в живом организме такая активация обычно происходит в печени подопытного животного. С помощью рассматриваемого теста можно оценить необходимость такого рода активации включением в исследуемую пробу экстрактов печени млекопитающих, полученных после осаждения митохондрий. Около 85% всех известных канцерогенов яв-

Таблица 13.4. Штаммы рода *Salmonella*, используемые для выявления мутагенности^а

Штамм	Мутация гена	Тип мутации	Другие дефекты	R-фактор
TA 1535	<i>G46</i>	Замена оснований	<i>rfa</i> , $\Delta uvrB$	—
TA 1537	<i>C3076</i>	Сдвиг рамки	То же	—
TA 98	<i>D3052</i>	То же	»	+
TA 100	<i>G46</i>	Замена оснований	»	+
TA 1538 ^б	<i>D3052</i>	Сдвиг рамки	»	—
TA 1978 ^б	<i>D3052</i>	То же	<i>rfa</i> , <i>uvr</i> ⁺	—

^а Штаммы хранятся у д-ра Эймса, отделение биохимии, Калифорнийский университет, Беркли, СА 94720.

^б Эти два штамма различаются лишь по способности к репарации с вырезанием участков ДНК. Сравнение зон торможения роста, вызываемого различными соединениями в спот-тесте (капельном тесте), позволяет оценить летальное действие, обусловленное повреждениями в ДНК.

ляются мутагенами, в то время как менее 10% неканцерогенных соединений обладают мутагенным действием. Это свидетельствует об относительно высокой степени корреляции между указанными двумя свойствами, а также о том, что значительная часть опухолей млекопитающих может возникать как результат индуцированных соматических мутаций.

В тесте Эймса используется группа гистидиновых ауксотрофов *Salmonella typhimurium*. Штаммы этой группы имеют специфические мутации в одном из структурных генов биосинтеза гистидина, включая сдвиг рамки и мутации с заменой оснований (свойства штаммов см. в табл. 13.4). У этих штаммов нарушена система вырезания и репарации (*uvrB*) и система образования липополисахаридной капсулы, которая в норме покрывает снаружи бактерию (*rfa*). В последнее время были также получены штаммы, содержащие R-фактор (определяемая плазмидами устойчивость к антибиотикам), которые с успехом используются для выявления мутагенности нескольких классов канцерогенов.

Постановка теста заключается в смешивании бактериальных клеток с препаратом ферментов печени, полученным после осаждения митохондрий, и предполагаемым мутагеном в агаре, предназначенном для верхнего слоя, с последующим наслаиванием смеси на соответствующий минимальный агар в чашке. Существует и другой вариант, когда исследуемый агент либо в кристаллической форме, либо в каплях на дисках фильтровальной бумаги, наносят на поверхность агара, в верхнем слое которого присутствуют бактерии и ферментный препарат. Летучие соединения можно изучать при инкубации чашек, содержащих бактерии и микросомы, в эксикаторе, в замкнутое пространство которого введено исследуемое вещество. Описание дополнительных деталей постановки эксперимента в данном случае см. в работе [8].

Приготовление среды

1. В чашки Петри диаметром 100 мм и высотой 15 мм разливают по 30 мл минимального агара М56 (разд. 13.9.10), содержащего 1,5% агара и 2% глюкозы.

2. Готовят 100 мл исходного раствора агара для верхнего слоя, содержащего 0,65% агара и 0,5% NaCl (разд. 13.9.20). Добавляют к нему L-гистидин·HCl и биотин до конечной концентрации 0,05 мМ каждый (приливают 10 мл исходного раствора с концентрацией обоих веществ 0,5 мМ к 100 мл агара верхнего слоя) и хранят при 45°C до использования. Благодаря присутствию небольшого количества гистидина бактериальные клетки способны несколько раз поделиться, что усиливает мутагенный эффект исследуемых соединений.

Приготовление фракций S-9

Фракцию ферментов (называемую S-9) готовят следующим образом.

1. Индуцируют синтез микросомных ферментов печени у самцов крыс (линия Sprague-Dawley/Bio-1) весом около 200 г внутрибрюшинной инъекцией 0,5 мл раствора Agosclor 1254 (полихлорированный дифенил, 200 мг/мл в кукурузном масле).

2. Кормят крыс смесью Purina Lab Chow и позволяют им свободно пить в течение 5 дней.

3. Не дают пищи крысам в течение 12 ч, а затем забивают их оглушающим ударом по голове или декапитацией после цервикального смещения.

4. Извлекают из животных печени, взвешивают их, промывают стерильным раствором 0,1 М KCl, измельчают стерильными ножницами и в гомогенизаторе Поттера — Элвехема с тефлоновым пестиком. При гомогенизации на 1 г сырого веса печени берут 3 объема 0,15 М NaCl; все операции проводят на льду.

5. Центрифугируют гомогенат при 9000 g в течение 10 мин и разливают надосадочную жидкость (S-9) аликвотами по 1—2 мл в маленькие пластмассовые пробирки. Быстро замораживают их на сухом льду и хранят при —80°C до момента использования. В 1 мл приготовленного таким образом раствора с концентрацией белка около 40 мг/мл содержатся микросомы из 250 мг (сырого веса) печени.

Если имеющееся в лаборатории оборудование не позволяет выделить фракцию S-9, как описано выше, ее

можно купить (разд. 13.10.2). Однако у нас нет опыта работы с имеющимися в продаже препаратами и мы ничего не можем сообщить читателю об их качестве.

Приготовление смеси S-9

Находящуюся в пробирке фракцию S-9 оттаивают при комнатной температуре, ставят в лед и используют только в течение одного дня. В эксперименте используют смесь S-9, в 1 мл которой содержатся: фракция S-9 (0,04—0,1 мл), 8 мкМ $MgCl_2$, 33 мкМ KCl, 5 мкМ глюкозо-6-фосфата, 4 мкМ NADP и 100 мкМ Na-фосфатного буфера, pH 7,4. Исходные растворы NADP (0,1 М) и глюкозо-6-фосфата (1 М) готовят на стерильной воде и хранят при $-20^{\circ}C$. Таким же образом можно приготовить, проавтоклавируют и хранить в холодильнике исходные солевые растворы (0,4 М $MgCl_2$ — 1,65 М KCl) и фосфатный буфер (0,2 М, pH 7,4). Смесь S-9 готовят заново каждый день, ее можно хранить в течение нескольких часов во льду. Образцы смеси следует проверять на бактериальное загрязнение. В случае необходимости смесь S-9 перед использованием фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Приготовление исследуемых веществ

Вещества, подлежащие тестированию, готовят и хранят в пробирках разового пользования с завинчивающимися крышками, имеющими изнутри тефлоновое покрытие. Водонерастворимые вещества обычно растворяют в диметилсульфоксиде. В качестве других растворителей могут быть использованы формамид, *n*-диоксан, этанол, диметиловый эфир этиленгликоля или ацетонитрил. Выбор растворителя зависит от растворимости исследуемого вещества. Многие вещества можно хранить при $-20^{\circ}C$ или в холодильнике; однако вещества с высокой реакционной способностью, такие, как алкилирующие агенты, следует готовить непосредственно перед самым опытом.

Постановка опыта

1. Обычно в случае постановки опыта с посевом в чашки с агаром к 2 мл агара верхнего слоя (разд. 13.9.20) при 45°C добавляют 0,1 мл проинкубированной в течение ночи в бульоне Oxoid (разд. 13.9.7) культуры штамма, на котором собираются вести испытания. К этим компонентам добавляют также 100 мкл (или больше) испытываемого вещества и 0,5 мл смеси S-9.

2. Получившуюся смесь сразу же перемешивают с помощью встряхивателя типа Vortex, работающего в медленном режиме, или вращением пробирки между ладонями и выливают на поверхность находящегося в чашке минимального агара с глюкозой (разд. 13.9.10).

3. Осторожными движениями покачивают чашку, чтобы верхний слой агара распределился равномерно. Вся процедура в целом занимает не более 20 с.

4. Дают агару застыть в темноте за несколько минут; затем переворачивают чашку вверх дном и инкубируют в темноте при 37°C.

5. Через 2 дня инкубации отмечают колонии гистициновых ревертантов и убеждаются в наличии слабого фонового роста бактерий в агаре благодаря небольшому количеству гистидина, добавленного к среде. Чтобы выяснить, нуждается ли то или иное вещество в предварительной активации, имеет смысл проводить испытания как в присутствии, так и в отсутствие смеси S-9. Помимо опытных чашек должны быть и контрольные, содержащие: 1) только культуру бактерий, 2) бактерии с известными мутагенами (включая такой, который заведомо требует активации), 3) бактерии со смесью S-9 (без мутагена).

Если мутагены нужно проверить нанесением на диски, их не включают в состав смеси верхнего слоя агара, а наносят позже по несколько кристаллов, растворенных в воде, спирте или диметилсульфоксиде, на поверхность стерильных бумажных дисков диаметром 6 мм. Для некоторых веществ этот метод мало эффективен, вероятно, из-за их адсорбции на фильтре. В некоторых случаях мутагены наносят непосредственно на поверхность ага-

ра, правда, для получения положительного результата с плохо растворимыми веществами требуются довольно большие концентрации.

Возможные трудности

Предупреждение. Используемая в экспериментах *S. typhimurium* относится к микроорганизмам, патогенным для человека (класс II). Эта бактерия является одним из главных возбудителей пищевых отравлений и в случае попадания внутрь может вызывать тяжелые формы поноса, рвоты, гастроэнтерита. Несмотря на слабую вирулентность лабораторных штаммов, особенно тех, которые лишены липополисахаридной капсулы, обращаться с ними следует очень осторожно. Все пипетки должны быть снабжены ватными пробками, а материал, содержащий эту бактерию, нельзя насасывать в пипетку ртом. Перед удалением культуры должны автоклавироваться. Сотрудники лаборатории, принимающие антибиотики, должны быть особенно осторожны при работе со штаммами, плазмиды которых детерминируют R-фактор.

Большая осторожность необходима и в обращении с высокотоксичными мутагенами, обладающими канцерогенными свойствами. Исследования этих веществ лучше всего проводить в специально отгороженном от остальной лаборатории помещении. Взвешивание опасных материалов и разлив по чашкам агара верхнего слоя, содержащего мутагены, нужно проводить под тягой. Инкубируют пробы также под хорошей тягой, причем вытягиваемый воздух должен поступать в канал, не сообщающийся с общим каналом тяги лаборатории. Сотрудники должны проводить эксперименты в лабораторных халатах и перчатках, а при работе с летучими препаратами использовать респираторы.

При интерпретации результатов нужно учитывать, что метод нанесения исследуемого вещества на поверхность агара (спот-тест), будучи полезным при обследовании большого числа изучаемых мутагенов, дает только качественные данные. Он мало приемлем для таких химических агентов, которые, как большинство водонерастворимых полициклических углеводов, не диффундируют в агар. Даже при использовании более чув-

ствительного и допускающего количественную оценку метода наслоения (внесения исследуемого вещества в расплавленный агар верхнего слоя) важно проверять несколько различных концентраций исследуемых веществ, чтобы определить, имеется ли линейная зависимость индукции обратных мутаций от концентрации. В случае выраженной гибели бактерий исследуемого штамма, что проявляется в ослаблении роста бактериального газона, необходимо убедиться в том, что это происходит на линейном участке кривой доза — ответ, а не при тех концентрациях, когда степень летальности клеток относительно преобладает над мутагенностью. Степень летальности клеток можно определить сравнением действия данного вещества на нормальный штамм, используемый в пробе, и на штамм с нарушенной системой репарации (*uvrB*). Другой фактор, влияющий на результаты, — фракция S-9. Мутагенный эффект может несколько изменяться от одного образца фракции S-9 к другому, поэтому желательно проверять каждый новый образец в различных концентрациях с несколькими стандартными веществами, такими, как 2-аминофлуорен, 7,12-диметилбензантрацен и афлатоксин В1 [8].

Вещество обычно считается немутагенным, если 1 мг этого вещества при исследовании включением в агар не дает двукратного увеличения числа обратных мутаций по сравнению с фоном спонтанных обратных мутаций. Некоторые вещества при стандартной постановке пробы включением в агар проявляют слабую мутагенность. Для таких соединений чувствительность пробы можно повысить, проведя 30-мин преинкубацию в растворе перед посевом. Чтобы провести преинкубацию, смешивают в *указанной последовательности* в стерильной стеклянной пробирке: 0,1 мл раствора исследуемого вещества, 0,5 мл смеси S-9 и 0,1 мл бактериальной культуры. Инкубируют 30 мин при 30 °С (или 20 мин при 37 °С), слабо перемешивая. Добавляют 2 мл агара верхнего слоя (разд. 13.9.20), перемешивают и выливают в чашку с нижним слоем минимального агара М56 (разд. 13.9.10). Инкубируют и учитывают колонии, так же как в случае стандартной процедуры.

Случается, высокая частота спонтанных обратных мутаций у используемых штаммов смазывает истинную

картину. Как правило, это происходит из-за присутствия в среде мутагенов. Возможно, эти мутагены содержатся в некоторых партиях питательного бульона; поэтому для выращивания штаммов, используемых в опытах, рекомендуется бульон Oxoid (разд. 13.9.7). Кроме того, отдельные партии пластмассовых чашек Петри розового пользования могут содержать значительное количество окиси этилена, мутагенной по своей природе. В настоящее время можно приобрести чашки Петри, которые не стерилизуются окисью этилена (разд. 13.10.2).

13.9. РЕЦЕПТЫ СРЕД

13.9.1. L-Бульон

(для *E. coli* и других энтеробактерий)

Гриптон	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	0,5 г
Дистиллированная вода	1 л

Доводят рН до 7,0 добавлением 1 н. NaOH и автоклавируют 15 мин под давлением 10^5 Па при 121 °С. После автоклавирования добавляют 10 мл стерильного 20%-ного раствора декстрозы.

13.9.2. L-Agar

Добавляют 15 г агара на 1 л L-бульона и разливают по 20—25 мл в чашки Петри (100×15 мм).

13.9.3. Лактозо-тетразолиевая среда

Среда № 2 (для определения устойчивости к антибиотикам)	25,5 г
Дистиллированная вода	950 мл
2,3,5-Трифенилтетразолийхлорид (Sigma Chemical Co)	50 мг

Сначала растворяют среду № 2, затем добавляют к ней тетразолийхлорид и нагревают до тех пор, пока он не растворится полностью. Автоклавируют 15 мин при

121 °С, добавляют 15 мл стерилизованного отфильтрованного 20%-ного раствора лактозы после автоклавирования и разливают в чашки Петри размером 100×15 мм.

13.9.4. Трис-малеиновый буфер (ТМ-буфер)

Трис	6 г
Малеиновая кислота	5,8 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 мг

Добавляют дистиллированной воды до 1 л, доводят рН (если это необходимо) до 6,0 и автоклавируют в течение 15 мин при 121 °С. После охлаждения среды до температуры около 50 °С добавляют в стерильных условиях:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 г
Ca(NO ₃) ₂	5 мг

13.9.5. Сульфаниламидный бульон

Минимальную солевую среду М56 (разд. 13.9.8) дополняют следующими компонентами:

Смесь казаминовых кислот, не содержащая витаминов	0,1%	Урацил	2,5 мкг/мл
Ксантин	25 мкг/мл	5-Бромурацил	50 мкг/мл
		L-Триптофан	20 мкг/мл
		Сульфаниламид	1 мкг/мл

13.9.6. На-ацетатный буфер

NaC ₂ H ₃ O ₂ ·3H ₂ O	13,6 г
Дистиллированная вода	1 л

Доводят рН до 4,6 добавлением концентрированной уксусной кислоты.

13.9.7. Бульон Oxoid

Среда Oxoid № 2	25 г
Дистиллированная вода	1 л

Стерилизуют автоклавированием в течение 15 мин при 121 °С.

13.9.8. Минимальная среда М56

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,2 г
KH_2PO_4	2,7 г
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 мг

Добавляют дистиллированной воды до 1 л, доводят рН до 7,2 и автоклавируют 15 мин при 121 °С (10^5 Па). После охлаждения среды до температуры около 50 °С добавляют в стерильных условиях:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 г
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5 мг

Для использования этой смеси в качестве ростовой среды добавляют 10 мл стерильной 20%-ной глюкозы.

13.9.9. Среда М56/2

Среду М56 разводят стерильной дистиллированной водой в отношении 1 : 1.

13.9.10. Минимальный агар М56

Готовят минимальную среду М56 (разд. 13.9.8), автоклавируют, добавляют 10 мл 20%-ной глюкозы и соответствующие наборы аминокислот и витаминов. 1 объем полученной среды М56 добавляют к 1 объему 3,2%-ного агара (32 г агара на 1 л воды). Среду и агар автоклавируют порознь при 121 °С. Хорошо перемешивают, дают раствору отстояться до выхода всех пузырьков воздуха и разливают по чашкам.

**13.9.11. Питательный бульон
(среда общего назначения)**

Порошок питательного бульона	8 г
Дистиллированная вода	1 л

13.9.12. Питательный агар

Порошок питательного бульона	8 г	или Питательный агар	23 г
Агар	15 г	Дистиллированная вода	1 л
Дистиллированная вода	1 л		

Автоклавируют при 121 °С (10⁵ Па) в течение 15 мин и разливают по 20—25 мл в чашки Петри размером 100×15 мм.

13.9.13. Бульон Penassay (для *Bacillus subtilis* и других бактерий)

Среда для определения антибиотиков Difco № 3	17,5 г
Дистиллированная вода	1 л

или

Мясной экстракт	1,5 г	NaCl	3,5 г
Дрожжевой экстракт	1,5 г	КН ₂ РO ₄	1,32 г
Пептон	5,0 г	К ₂ НРO ₄	3,68 г
Декстроза	1,0 г	Дистиллированная вода	1 л

Автоклавируют при 121 °С в течение 15—20 мин.

13.9.14. Агар с антибиотиками

К автоклавированному питательному агару (разд. 13.9.12) добавляют один из следующих растворов антибиотиков, стерилизованных фильтрованием:

Сульфат стрептомицина (Sigma)	100 мкг/мл
Пенициллин G (Sigma или Squibb)	500 мкг/мл
Рифампин (Sigma)	50 мкг/мл

13.9.15. Минимальный бульон или агар Дэвиса

В одну колбу (например, в двухлитровую колбу Эрленмейера) вносят:

К ₂ НРO ₄	7 г	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 г
КН ₂ РO ₄	2 г	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 г
Цитрат натрия	0,5 г	Дистиллированная вода	500 мл

В отдельную колбу вносят:

Агар (не нужен для пригото- вления бульона)	15 г
Декстроза	5 г
Дистиллированная вода	500 мл

Оба раствора автоклавируют при 121°C (10⁵ Па) 15 мин и дают им остыть до температуры около 55°C. Растворы объединяют, перемешивают и разливают по чашкам Петри размером 100×15 мм.

13.9.16. Бархатные репликаторы

В качестве репликаторов используют обычно квадратные кусочки бархата со стороной 15 см. Их заворачивают пачками по 10—20 шт. в плотную бумагу и автоклавируют в течение 10—15 мин при 121°C в аппарате, имеющем быстрый выход пара и вакуумное высушивание.

13.9.17. LC-Агар для верхнего слоя (для локального мутагенеза)

Триптон	10 г	Агар	7 г
Дрожжевой экстракт	5 г	Дистиллированная	
NaCl	5 г	вода	1 л

Ингредиенты растворяют, распределяют по бутылкам и автоклавируют при 121°C в течение 20—25 мин.

13.9.18. LC-Агар (для локального мутагенеза)

Триптон	10 г	Агар	10 г
Дрожжевой экстракт	5 г	Дистиллированная	
NaCl	5 г	вода	1 л

Автоклавируют 30 мин при 121°C. Перед заливкой в чашки на каждый литр смеси добавляют следующие предварительно простерилизованные растворы:

0,5 М CaCl ₂	4 мл
20%-ная глюкоза	5 мл
0,25%-ный тимидин	40 мл

13.9.19. Спектиномициновый или стрептомициновый агар (для локального мутагенеза)

Готовят L-агар (разд. 13.9.2). После автоклавирования в стерильных условиях добавляют спектиномицин (2 мл простерилизованного фильтрованием 5%-ного раствора) или сульфат стрептомицина (1 мл простерилизованного фильтрованием 10%-ного раствора). Тщательно перемешивают и разливают по чашкам.

13.9.20. Агар для верхнего слоя (для теста Эймса)

NaCl	5 г
Агар	6,5 г
Дистиллированная вода	1 л

Растворяют нагреванием и распределяют порциями по 100 мл в колбы. Автоклавируют 15 мин при 121 °С и охлаждают до температуры около 50 °С. После автоклавирования на каждые 100 мл агара добавляют 10 мл стерильного исходного раствора, в состав которого входят следующие вещества:

L-Гистидин·HCl (0,5 мМ)	10,5 мг/100 мл
Биотин (0,5 мМ)	12,2 мг/100 мл

13.10. ИСТОЧНИКИ ШТАММОВ И СПЕЦИАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

13.10.1. Штаммы

Штаммы *Escherichia coli*. Генетический центр, коллекция штаммов кишечной палочки, д-р Барбара Бахман. Отделение генетики человека, медицинский факультет Йельского университета, 333 Cedar St., New Haven, CT 06510.

Штаммы *Bacillus subtilis*. Куратор генетического центра — коллекции штаммов рода *Bacillus*, отделение микробиологии, Университет шт. Огайо, Колумбус, OH 43210.

Штаммы *Salmonella typhimurium* для проверки на канцерогенную/мутagenную активность. Д-р Брюс Н. Эймс, отделение биохимии, Калифорнийский университет, Беркли, Беркли, СА 94720.

13.10.2. Среда, химические агенты и реактивы

Ростовые среды. Агар, среды для определения чувствительности к антибиотикам, питательный бульон, декстроза и пр. Difco Laboratories, Detroit, MI, 48232; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD 21030.

Фосфаты и другие неорганические соли. Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, MO 63147. Общедоступны через компании, занимающиеся лабораторными поставками.

Аминокислоты, 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид, 5-бромурацил, 2-аминопурин, гидроксилламин, 5-метилтриптофан, этилметансульфонат, эритромицин, нитрозогуанидин, рифампин, пенициллин G, сульфат стрептомицина, дауномицин, глюкозо-6-фосфат, никотинамидадениндинуклеотидфосфат, сульфаниламид. Sigma Chemical Co., P. O. Box 14500, St. Louis, MO 63178.

ICR-191 и ICR-170 Polysciences, Inc., Paul Valley Industrial Park, Warrington, PA 18976.

Лактоза. Лактоза CHR (без примеси глюкозы). U. S. Biochemical Corp., Cleveland, OH 44122.

Метилметансульфонат, этилметансульфонат, нитрит натрия. Eastman Organic Chemicals Rochester, NY 14650.

Стандартные мутагены для испытаний. Бензо(α)пирен, 2-аминофлуорен, 4-нитро-о-фенилендиамин. Aldrich Chemical Co., 940 W. St. Paul Ave., Milwaukee, WI 53233, 9-Аминоакридин: Sigma Chemical Co., P. O. Box 14508, St. Louis, MO 63178.

Казаминовые кислоты. Кислый гидролизат казеина, или казаминовые кислоты (без витаминов) фирмы Difco Laboratories, Detroit, MI 48232. Кислый гидролизат казеина: U. S. Biochemical Corp., Cleveland, OH 44122.

Ароклор-1254. Analabs and Co., 80 Republic Drive, North Haven, CT 06473.

Диметилсульфоксид (спектрально чистый). Schwarz/Mann, Orangeburg, N. Y. 10962.

Среда Oxoid № 2. K. C. Biological, P. O. Box 5441, Lenexa, KS 66215.

Не стерилизованные окисью этилена чашки Петри (для теста Эймса). *Muta-Assay dishes*, номер по каталогу 1028, Falcon Laboratories, 1950 Williams Dr., Oxnard, CA 93030 (805 485—8711).

Имеющиеся в продаже препараты S-9. Доступны из следующих источников: Marketing Manager, Bionetics Laboratory Products, Litton Bionetics, Inc., 5516 Nicholson Lane, Kensington, MD 20795 (301/881-5600), Meloy Laboratories, Inc., 6715 Electronic Dr., Springfield, VA 22151 (703/642-4800).

Благодарность

Нам хотелось бы поблагодарить тех, кто оказал нам помощь при подготовке этой главы: С. Кашнера и У. Чемпнея за советы по методикам локализованного мутагенеза, Линн Харон за указания по описанию теста Эймса, Л. Орнстона за просмотр всей главы и Дебби Чендлер за неоднократное перепечатывание рукописи.

13.11. ЛИТЕРАТУРА

13.11.1. Общая литература

1. *Clowes R. C., Hayes W.* Experiments in microbial genetics. John Wiley and Sons, Inc., New York (1968).
Сборник, включающий описание экспериментов с бактериями, бактериофагами и грибами рода *Aspergillus*; основу сборника составляют лекции, прочитанные в Хаммерсмитской клинике Лондона (Англия). Описываемые эксперименты охватывают широкую область исследований — от флуктуационного теста с фагами до генетического картирования организмов рода *Aspergillus*. Составлен по пунктам в стиле лабораторного руководства.
2. *Drake J. W.* The molecular basis of mutation. Holden-Day, San Francisco, 1970
Одна из немногочисленных полных монографий по молекулярным механизмам мутаций. Хотя с момента ее выхода прошло несколько лет, она и сейчас представляет большую ценность для общего ознакомления с вопросами мутагенеза.
3. *Drake J. W., Baltz R. H.* The biochemistry of mutagenesis. Annu. Rev. Biochem., 45, 11—37 (1976).
Дополненная монография Дрейка, вышедшая в 1970 г., с акцентом на различные типы нарушения репарации ДНК, которые могут сами по себе оказывать мутагенный эффект.
4. *Miller J. H.* Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1972. [Имеется перевод:

Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976.]

Сборник, включающий описание довольно сложных экспериментов по бактериальной генетике, многие из которых взяты из курса лекций, прочитанных в летнее время в Колд-Спринг-Харборе. Хотя большинство экспериментов относится только к лактозному оперону *E. coli*, принципы обработки мутагенами, методы отбора и нахождение характеристик мутантов применимы для широкого круга молекулярно-генетических экспериментов.

13.11.2. Специальная литература

5. *Adelberg E. A., Mandel M., Chen G. C. C.* Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 788—795 (1965).
6. *Allen M. K., Yanofsky C.* A biochemical and genetic study of reversion with the A-gene A-protein system of *Escherichia coli* tryptophan synthetase. *Genetics*, **48**, 1065—1083 (1963).
7. *Ames B. N.* Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, **204**, 587—593 (1979).
8. *Ames B. N., McCann J., Yamasaki E.* Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347—364 (1975).
9. *Carlton B. C., Whitt D. D.* The isolation and genetic characterization of mutants of the tryptophan system of *Bacillus subtilis*. *Genetics*, **62**, 445—460 (1969).
10. *Coulondre C., Miller J. H.* Genetic studies of the *lac* repressor. IV. Mutagenic specificity in the *lac I* gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **117**, 577—606 (1977).
11. *Davis B. D.* Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 4267 (1948).
12. *Guerola N., Ingraham J. L., Gerdá-Olmeda E.* Induction of closely-linked multiple mutations by nitrosoguanidine. *Nature (London)*, **230**, 122—125 (1971).
13. *Hong J., Ames B. N.* Localized mutagenesis of any specific small region of the bacterial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 3158—3162 (1971).
14. *Kushner S. R., Maples V. F., Champney W. S.* Conditionally lethal ribosomal protein mutants: characterization of a locus required for modification of 50S subunit proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 467—471 (1977).
15. *Lederberg J.* Detection of fermentative variants with tetrazolium. *J. Bacteriol.*, **56**, 695 (1948).
16. *Lederberg J.* Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. *Methods Med. Res.*, **3**, 5—22 (1950).
17. *Lederberg J., Lederberg E. M.* Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, **63**, 399—406 (1952).
18. *Lederberg J., Zinder N. D.* Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 4267—4268 (1948).
19. *Miller E. C., Miller J. A.* The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations, p. 83—119. In A. Hollaen-

- der (ed.), Chemical mutagens, vol. 1, Principles and methods for their detection. Plenum Press, New York (1971).
20. *Novick R. P.* Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **33**, 210—263 (1969).
21. *Ornston L. N., Ornston M. K., Chou G.* Isolation of spontaneous mutant strains of *Pseudomonas putida*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 179—184 (1969).
22. *Osborn M., Person S., Phillips S., Funk F.* A determination of mutagen specificity in bacteria using nonsense mutants of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, **26**, 437—447 (1967).
23. *Prakash L., Sherman F.* Mutagenic specificity: reversion of iso-1-cytochrome *c* mutants of yeast. *J. Mol. Biol.*, **79**, 65—82 (1973).
24. *Szybalski W.* Microbial selection. I. Gradient plate technique for study of bacterial resistance, *Science*, **116**, 46—48 (1952).
25. *Willets N. S., Clark A. J., Low K. B.* Genetic location of certain mutations conferring recombination deficiency in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **97**, 244—249 (1969).

ПЕРЕНОС ГЕНОВ

Р. Кёртис III

Обычно рассматривают три типа переноса генов у бактерий. Первый тип — *трансформация* — это такой процесс, при котором ДНК одной бактерии — донора переходит в другую бактерию — реципиент. Реципиентная клетка, в которой происходит экспрессия генетических признаков донора, называется трансформантом. Второй тип — *трансдукция* — это процесс генного переноса, при котором бактериальный вирус (бактериофаг), размножающийся в клетках бактериального штамма-донора, включает в себя часть генетической информации бактерии и после инфицирования другого, реципиентного, штамма вызывает иногда наследуемые изменения у последнего. Реципиентная клетка, которая таким путем приобретает признаки донора, называется трансдуктантом. Третий тип переноса — *конъюгация* — это процесс, при котором клетки бактериального штамма-донора вступают в непосредственный механический контакт с клетками реципиентного штамма и передают последнему генетический материал. Реципиент, который получает этот материал, называется трансконъюгантом. Наряду с процессом мутирования генов трансформация, трансдукция и конъюгация играют важную роль в появлении новых типов бактерий. Эти процессы очень важны также потому, что они позволяют исследователям, занимающимся бактериальной генетикой, выяснять биохимические и генетические аспекты функционирования бактерий, устанавливать принципы строения, функционирования и регуляции генов, а также более сложных процессов синтеза макромолекул, роста и деления клеток.

14.1. ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформация хорошо известна и подробно изучена для некоторых штаммов *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus san-*

guis, Neisseria gonorrhoeae, Acinetobacter calcoaceticus [25, 31, 36]. Способность или неспособность к трансформации для любого бактериального штамма зависит от его *компетентности*, под которой понимают способность реципиентного штамма включать ДНК из культуральной среды внутрь клетки.

Трансфекция — процесс, аналогичный трансформации, при котором выделенная ДНК бактериального вируса, будучи внесенной в культуру компетентного реципиента, обуславливает образование фаговых частиц. В тех случаях, когда в компетентную реципиентную клетку не попадает фаговый геном весь целиком, для его образования необходимо, чтобы в клетке-реципиенте прошла рекомбинация проникших в нее нескольких неполных фаговых хромосом.

Успешное осуществление трансформации определяется использованием высокомолекулярной двухцепочечной ДНК и созданием специфичных условий, в которых популяция реципиентных клеток проявляет максимальную компетентность. Последнее часто зависит от таких факторов, как стадия в цикле роста популяции реципиента, питательная ценность культуральной среды, уровень аэрации, рН, наличие нужных концентраций двухвалентных катионов и в большинстве случаев генотип реципиента.

В отношении последнего свойства среди наиболее важных моментов укажем структуру клеточной поверхности, образование факторов компетентности, способность подвергаться автолизу и присутствие или отсутствие профагов (умеренных бактериальных вирусов, геном которых реплицируется синхронно с геномом бактерии-хозяина).

При изучении трансформации необходимо, чтобы штаммы донора и реципиента различались по легко распознаваемым генетическим признакам. Как правило, используются реципиенты, несущие мутации, которые обуславливают неспособность синтезировать какой-либо метаболит или утилизировать какой-либо источник углерода, или же реципиенты с признаками дикого типа, чувствительные к некоторым антибиотикам, химическим препаратам или фагам. Доноры же должны иметь противоположные аллели, которые легко выявля-

ются в том случае, если трансформант их унаследовал. Методы выделения и определения характеристик мутантных штаммов описаны в гл. 13.

14.1.1. Выделение ДНК

Оптимальный метод выделения высокомолекулярной ДНК из донорного штамма или трансфецирующей ДНК бактериального вируса часто зависит от особенностей соответствующих бактерий или вирусов. Общие принципы и методы разрушения клеток грамотрицательных и грамположительных бактерий с целью выделения ДНК приведены в гл. 22. Чаще других для выделения и очистки высокомолекулярной ДНК из микроорганизмов применяется метод, описанный Мармуром [29]. Он подробно изложен в разд. 22.2.1. Однако в большинстве случаев использование высокоочищенных препаратов ДНК, не содержащих РНК и другие примеси, необязательно; поэтому можно обойтись без обработки рибонуклеазой. Специальные методы выделения ДНК плазмид описаны в гл. 15.

Для всех методов выделения ДНК характерна обязательная инаktivация бактериальных дезоксирибонуклеаз. В связи с этим трансформирующую ДНК обычно суспендируют в буфере, содержащем соли лимонной кислоты или натриевую соль ЭДТА. Эти соли образуют хелатные комплексы с двухвалентными катионами, такими, как магний, представляющими собой необходимые кофакторы для большинства дезоксирибонуклеаз. Препараты ДНК обычно хранят в стандартном цитратно-солевом буфере (0,15 М NaCl, 0,015 М трехзамещенный цитрат натрия, pH 7,0) или, в случае плазмидных и фаговых ДНК, для которых важно поддержание суперспирализованной кольцевой конфигурации, в буфере 10 мМ трис — 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

14.1.2. Количественное определение ДНК

Количество очищенной ДНК (не содержащей РНК и других примесей, поглощающих в ультрафиолете) можно определить, измерив ее концентрацию спектрофотометрически. Оптическая плотность при 260 нм в кю-

вете с длиной оптического пути 1 см, поделенная на 20, дает концентрацию ДНК в мг/мл. Таким образом, для концентрации ДНК 50 мкг/мл $A_{260}=1,0$. Для оценки чистоты препарата ДНК можно измерять оптическую плотность при 234, 270 и 280 нм и соотносить ее с оптической плотностью при 260 нм (разд. 22.4).

Для количественной оценки неочищенной ДНК можно использовать цветную пробу с дифениламином, детально описанную в разд. 22.4.3.

Концентрацию ДНК в препарате, предназначенном для опытов по трансформации, можно измерить также по радиоактивной метке, включив в ДНК меченый тимидин до определенного уровня. При этом нужно, чтобы донорный штамм имел мутацию *thyA*, при которой блокируется эндогенный синтез тимидинмонофосфата; желательно также наличие мутаций *deoB* или *deoC*, обуславливающих предотвращение распада дезоксирибозо-1-фосфата. Процесс мечения ДНК включает следующие процедуры:

1. В подходящую минимальную среду, такую, как среда VB-E (разд. 14.4.6), добавляют казаминовые кислоты без витаминов (до 0,5%; разд. 14.4.8).

2. Туда же вносят 5,0 мКи ^{14}C -тимидина или ^3H -тимидина и столько немеченого тимидина, чтобы общая концентрация его составила 4,0 мкг/мл.

3. Добавляют в среду клетки *thyA deoB* из расчета 10^6 клетка/мл и инкубируют культуру столько времени, чтобы клетки успели пройти 7 или больше делений.

4. Выделяют ДНК.

5. Наносят две одинаковые пробы ДНК объемом 25 мкл на диски фильтровальной бумаги Whatman 3ММ, наколотые на булавки из нержавеющей стали. Не ранее чем через 1 мин опускают фильтры в стакан с 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) для осаждения ДНК при комнатной температуре. Последующую промывку фильтров проводят в перфорированной емкости, представляющей собой полиэтиленовую бутылку с отрезанным горлышком, имеющую множество отверстий по бокам и на дне (отверстия можно сделать горячим трехгранным напильником).

6. Дважды промывают фильтры в 5%-ной ТХУ и два или три раза в этаноле, последовательно перенося пер-

форированную бутылку в стакан с соответствующим раствором.

7. Для высушивания бутылку с фильтрами помещают в сушильный шкаф, а затем измеряют радиоактивность каждого фильтра в сцинтилляционном счетчике (разд. 16.4.3).

8. В каждой пробе вычитают фон и подсчитывают число распадов в минуту, приходящееся на 1 мл препарата ДНК; для этого нужно знать эффективность счетчика для используемой сцинтилляционной жидкости (разд. 16.4.3).

9. Вычисляют концентрацию ДНК (в мкг/мл), зная удельную активность (в мкКи/мкг) суммарного меченого тимидина, добавленного в культуру, мол. % тимидина в ДНК, число распадов в 1 мин на 1 мл препарата ДНК и константу распадов в минуту для 1мкКи ($2,2 \cdot 10^6$).

14.1.3. Трансформация у *Acinetobacter calcoaceticus*

A. calcoaceticus — грамотрицательный оксидазоотрицательный неподвижный кокк, компетентность которого развивается под действием различных условий культивирования, а трансформация не зависит от присутствия двухвалентных катионов [23]. Трансформацию этой бактерии легко осуществить в лабораторных условиях. Савула и Кроуфорд [34] показали, что гены *trpA* и *trpB*, кодирующие две субъединицы триптофансинтазы, тесно сцеплены и трансформируются совместно; они разработали метод отбора одинарных и двойных трансформантов на первичной селективной среде. Метод основан на том, что штаммы с мутацией *trpA*, образующие большие колонии на агаровой среде с 10 мкг/мл L-триптофана или 40 мкг/мл индола, дают маленькие колонии на среде, содержащей всего 5 мкг индола в 1 мл. Таким образом, трансформация реципиента с мутацией *trpB*, растущего только в присутствии 10 мкг/мл L-триптофана, с помощью ДНК донора с мутацией *trpA* приводит к появлению клеток, которые при посеве на агаровую среду с 5 мкг/мл индола образуют и маленькие, и большие колонии. Маленькие колонии возникают вследствие со-

вместной трансформации мутации *trpA* с аллелем *trpB*⁺ донора, в то время как большие колонии — вследствие трансформации только аллеля *trpB*⁺ донора.

Штаммы

Штаммы как донора, так и реципиента были выделены из штамма BD413 — мутанта с недоразвитой капсулой, полученного из штамма BD4 дикого типа *A. calcoaceticus*, способного к трансформации [23]. Донорный штамм имеет мутацию *trpA23*, а реципиентный — мутацию *trpB18* [34]. Эти штаммы растут при температуре от 30 до 35 °С и хранятся при 4 °С на скошенном L-агаре. Пересевы на свежую среду должны производиться каждые 2 мес.

Среды

A. calcoaceticus можно культивировать на разнообразных полных средах, таких, как L-бульон или L-агар, бульон и агар Репассу, сердечно-мозговой бульон или агар. Можно также использовать различные минимальные среды, годится и среда VB-E. Работая с мутантами *trpB* и *trpA*, для стимуляции роста прототрофных рекомбинантов и одновременного предотвращения роста мутантов можно использовать кислотный гидролизат казеина, например казаминовые кислоты (0,5%), так как в процессе кислотного гидролиза триптофан разрушается. Методы приготовления сред см. в разд. 14.4.

Выделение ДНК методом Мармура [29]

ДНК донорного штамма *trpA* выделяют по Мармуру (разд. 22.2.1) или одним из простых способов, описанных ниже.

Выделение ДНК методом Савулы и Кроуфорда [34]

1. Выращивают клетки-доноры с использованием аэрации при 30—35 °С до ранней стационарной фазы в 10 мл L-бульона (разд. 14.4.1). Аэрацию осуществляют, применяя либо пробулькивание пузырьков воздуха через

среду в пробирках (пробирки диаметром 25 и высотой 200 мм, снабженные стеклянной палочкой с поперечником 4—5 мм; палочку облегает резиновая трубка, которая выходит через заворачивающуюся крышку пробирки; пробирку подсоединяют к аквариумному насосу с соблюдением правил стерилизации продуваемого воздуха), либо встряхивание на качалке в колбах, погруженных в водяную баню.

2. Клетки осаждают центрифугированием и суспендируют в 2,4 мл солевого буфера с ЭДТА (0,15 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, рН 8,0).

3. Добавляют 100 мкл 6%-ного додецилсульфата натрия и инкубируют суспензию 10 мин при 37°C для обеспечения лизиса клеток.

4. Осветляют лизат добавлением 50 мкл 5 М KCl и после охлаждения во льду центрифугируют 20 мин при 39 000 g.

5. Нагревают надосадочную жидкость, содержащую ДНК, при 50—60°C в течение 5 мин, чтобы убить все оставшиеся клетки.

6. Проверяют стерильность препарата посевом пробы в чашку с L-агаром (разд. 14.4.1), которую инкубируют ночь при 30—39°C.

7. Если нужно, осаждают ДНК добавлением двух объемов холодного этанола и наматывают ее на стеклянную палочку с маленьким крючком на конце (разд. 22.2.1). Растворяют ДНК в цитратносолевом буфере.

8. Определяют концентрацию ДНК цветной пробой с дифениламином (разд. 22.4.3), так как в полученном препарате могут содержаться РНК и другие примеси, поглощающие в ультрафиолете.

9. Хранят препарат ДНК при 4°C.

Выделение ДНК упрощенным методом Юни [22]

1. Отбирают петлей выросшую на скошенном агаре или на агаре в чашке бактериальную биомассу и суспендируют клетки в маленькой пробирке в 0,5 мл стерильного раствора, содержащего 0,15 М NaCl, 0,015 М трехзамещенный лимоннокислый натрий и 0,05%-ный додецилсульфат натрия.

2. Прогревают суспензию при 60—65°C в течение 1 ч.

3. Неочищенный лизат хранят при 4°C. Он сохраняет стабильность в отношении трансформирующей активности по крайней мере в течение года.

Осуществление трансформации

1. Выращивают реципиентный штамм *trpB* в L-бульоне (разд. 14.4.1) в течение ночи при 35°C, применяя аэрацию. (*A. calcoaceticus* может расти при любой температуре в интервале 30—37°C; несколько ускоренный рост наблюдается при 35°C.)

2. Разводят культуру в 10 раз свежим подогретым L-бульоном и аэрируют ее либо пропусканием пузырьков воздуха, либо на качалке в течение 2 ч при 35°C.

3. В каждую чашку с минимальным агаром VB (разд. 14.4.6) (дополненным 0,5% казаминовых кислот, 0,5% глюкозы и 5 мкг/мл индола) вносят 100 мкл компетентной культуры реципиента и различные количества препарата ДНК донора (возрастающие количества от 10 до 200 мкл, или 20—500 мкг).

4. Немедленно смешивают оба препарата и распределяют их равномерно по поверхности агара стеклянным шпателем, предварительно промытым в этаноле, фламбированным и охлажденным.

5. В качестве контроля наносят и равномерно распределяют 100 мкл популяции клеток реципиента в чашку с селективной средой, чтобы убедиться в отсутствии ревертантов *trpB*⁺ или других посторонних бактерий.

6. Как дополнительный контроль наносят на агар и равномерно распределяют 100 мкл препарата ДНК донора в чашку с селективной средой, чтобы убедиться в отсутствии посторонних микроорганизмов.

7. Добавляют 10 мкл ДНКазы с концентрацией 100 мкг/мл в 0,2 М MgCl₂ к 100 мкл препарата донорной ДНК (находящейся в цитратносолевом буфере) примерно за 2—3 мин до смешивания на селективной среде со 100 мкл суспензии компетентных реципиентных клеток. Этот контроль должен подтвердить, что расщепление ДНК приводит к исчезновению колоний трансформантов.

8. Все чашки переворачивают и инкубируют ночь при 35 °С или до тех пор, пока колонии не станут ясно различимыми.

9. Просматривают чашки и, не повреждая колоний, подсчитывают общее число маленьких и больших колоний в каждой чашке.

10. Выделяют чистую культуру из нескольких маленьких колоний, чтобы определить, действительно ли свойства их клеток соответствуют фенотипам ожидаемых котрансформантов *trpA23 trpB⁺* (т. е. они продолжают зависеть от триптофана или индола и образуют большие колонии на средах, содержащих 40 мкг/мл индола). Выделяют чистую культуру из больших колоний, чтобы определить, действительно ли их рост не зависит от индола или триптофана. Это делают следующим образом.

а) Отбирают 10—20 отдельных колоний каждого типа (используя либо стерильные зубочистки, либо стерильные бактериальные иглы) в 1—2 мл солевого буфера с желатиной (СБЖ; разд. 14.4.7), находящегося в пробирках диаметром 13 и высотой 100 мм, или в микрокапельки СБЖ на стенках пластмассовой чашки Петри.

б) Высевают эти суспензии штрихом в чашки с селективной агаровой средой так же, как в случае получения отдельных колоний. Это делают с помощью стерильной иглы, если колонии суспендировали в очень маленьком объеме СБЖ, или с помощью стерильной бактериальной петли, забирая ею как можно больший объем суспензии со стенки пробирки, если колонии суспендировали в 1—2 мл СБЖ. Чашки с селективным агаром разделяют на 4—10 мелких секторов, чтобы иметь возможность очистить 4—10 образцов в одной чашке.

в) Инкубируют чашки при 35 °С в течение 1—2 сут.

г) Отбирают в СБЖ обособленные колонии, происходящие из отдельных трансформантов; полученные суспензии высевают штрихом на минимальный агар с добавкой 5 мкг/мл индола, 40 мкг/мл индола, 10 мкг/мл триптофана и на минимальный агар без добавок. Чашки инкубируют при 35 °С.

11. Анализируют результаты для того, чтобы определить, возрастает ли общее число трансформантов пропорционально количеству взятой в опыт ДНК донора. Обычно эта зависимость соблюдается; лишь в области высоких концентраций ДНК может наступать насыщение.

12. Вычисляют частоту котрансформации аллелей *trpA23* и *trpB⁺* и определяют, насколько эта величина постоянна и не зависит от концентрации ДНК.

*Модификации и другие эксперименты
по трансформации с A. calcoaceticus*

Вышеописанный метод можно сделать количественным, если добавлять известные количества донорной ДНК (1—500 нг/мл) к жидким культурам компетентных реципиентных клеток с концентрацией $1 \cdot 10^8$ — $2 \cdot 10^8$ клетка/мл. После инкубации в течение 10—15 мин при 35°C для остановки реакции добавляют на 1 мл смеси 10 мкл ДНКазы, растворенной в 1 М $MgCl_2$ в концентрации 0,5 мг/мл. Соответствующие разведения высевают на селективную среду и затем строят график зависимости абсолютного титра трансформантов от концентрации ДНК в логарифмических координатах.

Можно также определить стадию в цикле роста культуры, когда компетентность реципиента максимальна. Для этого вносят небольшие изменения в метод простой трансформации в чашке или применяют более количественный метод, описанный в предыдущем абзаце. В таком эксперименте следует в каждой пробе использовать одну и ту же концентрацию (или число) клеток реципиента. Для повышения точности такого эксперимента прежде всего нужно построить кривую роста реципиентного штамма в L-бульоне (разд. 14.4.1) при 35°C с аэрацией. В общих чертах методика определения зависимости частоты трансформации от стадии роста заключается в следующем. Клетки стационарной проинкубированной с аэрацией в течение ночи культуры осаждают центрифугированием и суспендируют в той же концентрации в свежем L-бульоне. Титр суспензии определяют посевом соответствующего разведения на L-агар (разд. 14.4.1). Делают разведения суспензии 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80 в колбах с L-бульоном и инкубируют при 35°C со встряхиванием. Через 15 и 30 мин отбирают пробы из разведения 1:5 и добавляют к ним донорную ДНК в насыщающей концентрации; эти пробы служат для оценки компетентности клеток в ранней, средней и поздней лаг-фазе. Пробы из разведений 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80 отбирают по достижении той оптической плотности, которая характерна для исходной культуры, разведенной 1:5; по ним оцениваются различные стадии логарифмической фазы роста. Культуру разведения 1:80

можно дорастить до больших плотностей, чтобы оценить компетентность клеток в поздней логарифмической, ранней стационарной и стационарной фазах. Однако перед добавлением ДНК такие пробы разводят до соответствующей стандартной плотности. К моменту добавления донорной ДНК для каждой пробы должно быть подсчитано число жизнеспособных реципиентных клеток. Зная эти цифры и начальные разведения, строят кривую роста и на этом же графике откладывают для каждой точки частоту трансформации. Максимум компетентности должен находиться в интервалах от поздней лаг- до ранней логарифмической фазы и от поздней логарифмической до ранней стационарной фазы.

Для определения в популяции реципиента абсолютно-го количества компетентных клеток, способных включать ДНК донора, используют радиоактивно меченную донорную ДНК с последующей радиоавтографией или математический анализ данных, касающихся зависимости частот трансформации двух несцепленных донорных маркеров, совместно и порознь, от концентрации ДНК донора. В общих чертах эти методы обсуждаются в работах Хейеса [18], а также Нотани и Сетлоу [31].

14.1.4. Трансформация у *E. coli*

Мандель и Хига [28] обнаружили, что обработка клеток *E. coli* CaCl_2 с последующими инкубацией на холоду и тепловым шоком приводит к включению ДНК, добавленной в среду. Их результаты дали толчок к разработке ряда приемов, позволяющих индуцировать состояние компетентности у бактерий различных родов и тем самым осуществлять трансформацию хромосомной и плазмидной ДНК, а также реализовать возможность трансфекции с помощью ДНК бактериофагов.

Бактериальные штаммы

В табл. 14.1 перечислены штаммы *E. coli* K-12, которые могут служить донорами и реципиентами в экспериментах по трансформации, а также трансдукции и конъюгации. Помимо генотипических различий между штаммами донора и реципиента, часто для улучшения спо-

Таблица 14.1. Штаммы *E. coli* K-12^a

Номер штамма	Тип конъюгации	Генотип ^б	Другие используемые обозначения
1	F ⁻	pYA13(pMB: Tn3; <i>Cel-imm</i> ⁺ <i>tet</i> ⁺ <i>bla</i> ⁺)/ <i>supE42</i> λ-	χ2239
2	F ⁻	<i>leu-5 proB59</i> Δ(<i>lacZOP1</i>)69 <i>tsx-98 supE42</i> Δ(<i>gal-uvrB</i>)40λ ⁻ <i>rspL206 argH70</i>	χ2087
3	F ⁻	<i>thr-16 tsx-63 purE41 supE42</i> λ- Δ <i>trpE63 his-53 srl-2</i> Δ <i>thyA57 endA1 mtlA9 metE98 cycB2 cycA1</i>	χ1836
4	F ⁻	<i>thr-1 ara-14 leu-6 proA2 lacY1 tsx-33 sup-37 galK2</i> λ ⁻ <i>sbcB15 his-4 recB21 recC22 rpsL31 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1 supE42</i> λ-	JC7623
5	F ⁻	<i>galK2</i> λ-	χ289
6	F ⁺	<i>lacZ81 supE42</i> λ-	W3102
7	F ⁺	<i>proC63 supE42</i> λ- <i>cycA1</i>	χ226
8	F ⁻	F14 <i>lac</i> ⁺ /Δ(<i>proB-lac</i>)41 <i>supE42</i> λ- <i>cycA1</i>	χ353
9	F ⁻	Δ(<i>proB-lac</i>)41 <i>supE42</i> λ- <i>his-53 nalA95 xyl-14 cycB2 rpoB309 cycA1</i>	χ1301
10	R ⁺	R100-1 (<i>drd-1 tet</i> ⁺ <i>cat</i> ⁺ <i>aadA</i> ⁺ <i>sul</i> ⁺ IncFII)/ <i>tsx-63 supE42</i> λ- <i>his-53 lysA32 xyl-14 arg-65</i>	χ1397
11	HfrOR4	λ- O- <i>thr leu proA lac ... pyrB F leu-50 supE42</i> λ- <i>rpsL206</i>	χ1784
12	F ⁻	<i>ara-14 leu-6 azi-6 tonA23 proA70 lacY1 tsx-67 purE42 supE44 galK2</i> λ- <i>trpE38 nalA94 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1</i>	χ433
13	F ⁻		χ585
14	F ⁻		χ2634

^a Перечисленные штаммы были выбраны потому, что они обладают простейшими комбинациями генетических свойств, позволяющих удобно проиллюстрировать теоретические положения и методы, описываемые в тексте. Не все перечисленные штаммы использовались в моей лаборатории или проверялись с помощью описанных в тексте методик.

^б Генетическая номенклатура соответствует номенклатуре, предложенной Демерцем и др. [14]; использованы условные знаки и символы хромосомных и плазмидных признаков в соответствии с работами Бахман и др. [5] и Новика и др. [32].

способности к трансформации используются дополнительные мутации у штаммов реципиента. У *E. coli* K-12 делеция галактозного оперона (мутации Δ*gal*), как, например, в штамме 2, приводит к удалению галактозы из липополисахаридной оболочки и значительно усиливает способность штаммов к трансформации плазмидной

ДНК и способность к трансфекции ДНК фага λ , но не фагов T1 и T7. Мутация *endA*, имеющаяся у штамма 3, приводит к исчезновению периплазматической эндонуклеазы I и очень сильно стимулирует трансформацию плазмидной ДНК, но почти не влияет на трансформацию линейными молекулами ДНК. Кослой и Оиши [9] обнаружили, что исчезновение экзонуклеазы V и экзонуклеазы I у штаммов *recB*, *recC*, *sbcB*, например у штамма 4, облегчает трансформацию *E. coli* хромосомной ДНК и усиливает трансфекцию ДНК фагов T1 и T7, но не ДНК фага λ . В то же время эти мутации не влияют или почти не влияют на трансформацию плазмидной ДНК.

Среды

В качестве комплексных сред используют L-бульон и L-агар (разд. 14.4.1) или бульон и агар Penassay (разд. 14.4.4). Можно также использовать различные минимальные среды, в том числе среду M9 [4], среду VB-E [37] и среду ML [10]. Для превращения среды в твердую добавляют 1,5% агара. В зависимости от генотипа используемого реципиентного штамма добавляют оптимальных концентраций (табл. 14.4) аминокислоты, пурины, пиримидины и витамины. Источники углерода обычно добавляют в конечной концентрации 0,5% (табл. 14.3); концентрация антибиотиков зависит от степени устойчивости, привносимой соответствующими мутациями и (или) генами (табл. 14.5). Методы приготовления сред см. в разд. 14.4.

Выделение ДНК

Хромосомную ДНК штаммов донора, таких, как штамм 1 (табл. 14.1), лучше всего выделять по методу Мармура ([29]; разд. 22.2.1). Для получения активных в отношении трансформации препаратов ДНК последние этапы выделения, на которых удаляются остатки РНК, проводить не обязательно. ДНК плазмиды рYA13 можно выделить из штамма 1 и использовать для трансформации. Плазмидную ДНК выделяют методами, описанными в гл. 15.

Осуществление трансформации

Описано большое число модификаций оригинальной методики Манделя и Хиги [28]. Мы считаем, однако, что наиболее эффективным является метод трансформации или трансфекции разнообразными хромосомными ДНК, а также ДНК фагов и плазмид, разработанный в нашей лаборатории на множестве реципиентных штаммов *E. coli* K-12 Гиллом и Александер. Он представляет собой модификацию метода, впервые использованного Эниа с соавторами [15], и ниже мы приводим его описание.

1. Выращивают культуру реципиентного штамма в объеме 5 мл в течение ночи в L-бульоне (разд. 14.4.1) при 37°C без перемешивания. Культуры, выращенные без принудительной аэрации, при продолжении культивирования на следующий день имеют значительно более короткую лаг-фазу перед началом экспоненциального роста по сравнению с аэрированными в течение ночи культурами, уже достигшими стационарной фазы роста.

2. Разводят культуру (1:100) в 40 мл L-бульона и инкубируют с аэрацией (либо пропусканием пузырьков воздуха, либо встряхиванием) при 37°C до достижения клетками ранней логарифмической фазы ($1 \cdot 10^8$ — $2 \cdot 10^8$ клетка/мл).

3. Охлаждают культуру во льду и осаждают клетки центрифугированием при 7000 g при 4°C.

4. Осторожно суспендируют клеточный осадок в 10 мл охлажденного во льду буфера, имеющего состав: 10 mM NaCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM ацетат натрия, pH 5,6.

5. Оставляют суспензию во льду на 20 мин и затем осаждают клетки центрифугированием.

6. Осторожно суспендируют клеточный осадок в 1—2 мл охлажденного во льду буфера, имеющего следующий состав: 75 mM CaCl₂, 100 mM MnCl₂, 10 mM ацетат натрия, pH 5,6. (В зависимости от конкретного штамма реципиента и типа используемой ДНК можно изменять концентрацию CaCl₂ в пределах от 25 до 100 mM и концентрацию MnCl₂ от 50 до 200 mM.)

7. Вносят пробы компетентных клеток объемом 200 мкл каждая в охлажденные пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм.

8. Добавляют к каждой пробе компетентных клеток 1—10 нг плазмидной или фаговой ДНК или 100—1000 нг хромосомной ДНК. Если ДНК донора находится в объеме, меньшем чем 20 мкл, то буфер, в котором она растворена, не окажет влияния на результат; однако в случае объема, большего чем 20 мкл, ДНК следует разводить CaCl_2 — MnCl_2 — Na-ацетатным буфером, pH 5,6, в котором суспендированы компетентные клетки.

9. Выдерживают смесь, содержащую ДНК и компетентные клетки во льду в холодной комнате в течение примерно 30 мин.

10. Подвергают смесь тепловому шоку при 30°C в течение 2,5 мин. Важна быстрая смена температуры; сама же температура шока и его длительность различны в зависимости от свойств реципиентного штамма. Например, 2 мин при 37°C или 1 мин при 42°C могут оказаться более эффективными, чем 2,5 мин при 30°C.

11. Вслед за тепловым шоком смесь нейтрализуют до pH 7,0 добавлением 3 мкл 2 М триса, pH 7,4.

12. Если донорный маркер, по которому ведется отбор, обуславливает устойчивость к антибиотику (в особенности бактерицидному), смесь разводят 1:10 ростовой средой и инкубируют при 37°C в течение 60—90 мин для экспрессии маркера устойчивости.

13. Высевают смесь (разведенную или неразведенную в зависимости от типа взятой ДНК, а также от того, разводили ее или нет для выявления экспрессии) на среду, позволяющую отобрать трансформированные клетки, и в соответствующем разведении на неселективную среду для определения выживаемости. Так как обработка клеток CaCl_2 делает их непрочными, следует использовать свежеприготовленную, не сильно подсыхшую среду. Важно также не допускать высыхания засеваемого материала: после распределения разведенной суспензии по поверхности агара дают ей впитаться в агар, приоткрыв слегка крышку чашки Петри на несколько минут.

14. Чашки инкубируют 1—2 сут при 37°C в соответствующем режиме, зависящем от маркера, по которому ведется отбор, и от скорости роста реципиентного штамма.

Применение

Трансформация — важный метод генетического анализа, так как имеющиеся в природе способные к трансформации виды не имеют систем конъюгации, и только небольшое число видов имеет хорошо развитые системы трансдукции. В аспекте фундаментальной науки трансформация позволила составить представление о механизме генетической рекомбинации [25, 31], а в случае *Bacillus subtilis* ее изучение способствовало получению информации о начале и направлении репликации хромосомы [18]. Данные экспериментов по внутривидовой и межвидовой трансформации использовались также для определения степени генетического родства между определенными участками генома [31]. Такой подход стимулировал изучение родства с использованием анализа кинетики реассоциации ДНК (гл. 22) и новейших методических приемов при исследовании рекомбинантной ДНК. Использование трансформации и трансдукции тесно связано с методологией изучения рекомбинантной ДНК, где благодаря искусственной индукции компетентности возможно введение рекомбинантных молекул в клетки различных видов бактерий.

14.2. ТРАНСДУКЦИЯ

Бактериальные вирусы делят на вирулентные, при инфицировании которыми все зараженные клетки гибнут с высвобождением новых фаговых частиц, и умеренные, вызывающие либо лизис инфицированных бактерий с высвобождением потомства новых фагов, либо их лизогенизацию [4]. В лизогенном состоянии фаговый геном, называемый уже профагом, реплицируется синхронно с бактериальной хромосомой в форме плазмиды или включаясь в хромосому. Несмотря на то что вирулентные фаги и вирулентные мутанты умеренных фагов способны к трансдукции, в природе основной приток генов в бактерии за счет трансдукции обусловлен лизогенными умеренными фагами, которые представляют собой наиболее простые системы для изучения.

Известны два типа трансдукции — специфическая и общая [18]. В случае *специфической трансдукции* могут

передаваться лишь генетические маркеры донора, прилежащие к интегрированному профагу. Под *общей трансдукцией* понимают передачу любого признака донора независимо от того, расположены ли его детерминанты в хромосоме, плазмиде или профаге. В соответствии с этим специфическая трансдукция наблюдается только в том случае, когда фаговый лизат получают путем спонтанного или индуцированного высвобождения фага из лизогенного донора, и никогда — в случае размножения фага в ходе литического продуктивного цикла. Вместе с тем в случае фагов, способных к общей трансдукции, генетическая информация донора может извлекаться как после индукции культуры лизогенного донора, так и в результате литического продуктивного цикла. Фаги, осуществляющие специфическую трансдукцию, содержат участки генетического материала донора, заместившие участки фагового генома. Таким образом, эти фаги представляют собой рекомбинанты, содержащие как собственную, так и генетическую информацию клетки-донора. При инфекции и лизогенизации определенного реципиентного штамма фагами, способными к специфической трансдукции, клетки этого штамма находятся в состоянии частичной диплоидии, когда имеется и генетическая информация донора, содержащаяся в трансдуцирующем фаге, и гомологичная генетическая информация в хромосоме реципиента. Если генетическая информация донора заменяет в фаге, осуществляющем специфическую трансдукцию, генетическую информацию, жизненно необходимую для размножения фага, трансдуцирующий фаг становится дефектным и неспособным к размножению и развитию в отсутствие интактного генома фага-помощника. В некоторых случаях, однако, фаг, способный к специфической трансдукции, не теряет главных функций, он может нормально осуществлять продуктивный литический цикл и образовывать стерильные пятна.

В наиболее изученных системах образование фагов, участвующих в общей трансдукции, сопровождается случайной упаковкой донорного генетического материала вместо фагового. Поэтому фаговые частицы, способные трансдуцировать ДНК донора, полностью дефектны. Реципиентная клетка, инфицированная такой частицей, в

отсутствие одновременной множественной инфекции нормальными фаговыми частицами приобретает только генетический материал донора, но не фага. Проникнув в реципиентную клетку, генетическая информация донора (если она хромосомного происхождения) интегрирует и заменяет генетическую информацию реципиента или существует отдельно без интеграции и репликации; образуются так называемые абортивные трансдуктанты. Фаги, осуществляющие общую трансдукцию, способны также включать в себя и трансдуцировать генетическую информацию плазмид. Последние могут приживаться в клетке-реципиенте и начинают реплицироваться синхронно с хромосомой реципиента.

При изучении трансдукции необходимо, чтобы донор и реципиент различались в отношении соответствующих легко распознаваемых генетических признаков. Обычно реципиент несет мутации, делающие его неспособным синтезировать какой-нибудь метаболит или использовать какой-нибудь источник углерода. Реципиент может также обладать признаком дикого типа, обуславливающим чувствительность к какому-либо антибиотику, препарату или фагу. Клетка-донор должна иметь противоположный аллель, по которому легче всего вести отбор в случае наследования этого признака трансдуктантами.

Общие методы

Чтобы получить специфически трансдуцирующие лизаты, нужен штамм донора, лизогенного по отношению к трансдуцирующему фагу. В зависимости от конкретной системы лизат можно приготовить индукцией штамма-лизогена ультрафиолетом или митомицином С; еще лучше, если у этого штамма имеется профаг, индуцируемый тепловой обработкой, для которого лизогения стабильно поддерживается при 30 °С, а литическая реакция индуцируется обработкой при температуре 37 °С [19]. Чтобы получить лизаты для общей трансдукции, инфицированные бактерии-доноры обычно выращивают в жидкой среде или высевают в чашки методом наслоения мягкого агара, где наблюдается сплошной лизис [2]. Для обеспечения максимального выхода фага и в том и

в другом случае выращивать и инфицировать бактерии нужно в среде с соответствующими концентрациями катионов. В большинстве случаев лизаты трансдуцирующих фагов хранят над хлороформом, который убивает все неинфицированные и неиндуцированные клетки донора.

Условия, обеспечивающие оптимальное инфицирование реципиентного штамма, зависят от используемой системы фаг — хозяин; особое внимание при этом уделяется содержанию ионов в среде и способам выращивания реципиента. В большинстве систем перед посевом с целью отбора трансдуктантов проводят предварительную адсорбцию фага на реципиентных клетках. Поскольку большинство фагов в трансдуцирующем лизате обладает инфекционностью и способно убить реципиентные клетки, применяются методы, позволяющие избегать инфекции и гибели трансдуцированных клеток. Легче всего этого достигают, если используют реципиент, лизогенный по трансдуцирующему фагу, так как лизогенные клетки иммунны к суперинфицированию гомологичным фагом. Можно также использовать такое количество фаговых частиц, чтобы на одну клетку приходилось меньше одной фаговой частицы. Этим сводится к минимуму возможность множественного инфицирования. Затем, по прохождении этапа предварительной адсорбции, добавляют либо фаговую антисыворотку, либо, если фаг нуждается для адсорбции в двухвалентных катионах, хелатообразующий агент. С помощью обоих последних приемов в основном предотвращают инфицирование потенциальных трансдуктантов фагом, высвободившимся из реципиентных клеток, которые были подвергнуты продуктивной инфекции.

Трансдуктанты выявляют и пересчитывают, высевая их на соответствующие селективные среды. В том случае, когда признак донора, по которому ведут отбор, рецессивен по отношению к аллелю реципиента и (или) обуславливает устойчивость к какому-либо бактерицидному агенту или веществу, посев делают не сразу, чтобы могла произойти сегрегация соответствующих признаков и они успели бы фенотипически проявиться.

14.2.1. Специфическая трансдукция (*E. coli* бактериофагом λ)

Штаммы бактерии и фага

Ввиду того что фаг λ обычно включается в хромосому *E. coli* между генами *gal* и *bio*, в норме этим фагом трансдуцируются генетические признаки, детерминируемые именно этими генами [4, 18, 22]. Трансдукцию можно продемонстрировать, взяв нелизогенный реципиентный штамм с мутацией в гене *gal*, например штамм 6 (табл. 14.1) и штамм донора *gal*⁺, например штамм 5 (табл. 14.1), подвергаемый лизогенизации фагом λ c1857. Последний несет мутацию, делающую температурочувствительным репрессорный белок, необходимый для наступления и поддержания лизогенного состояния: бактериальный штамм остается лизогеним, пока растет при 30 °С, но индуцируется и лизируется с высвобождением фага, если выращивается при 37 °С.

Среды

Используют супер-бульон (разд. 14.4.3), содержащий 10 мМ Mg²⁺, лямбда-агар, или мягкий агар (разд. 14.4.2), агар ЕМВ (разд. 14.4.5) + 1% галактозы (ЕМВ+Gal) или агар ЕМВ без добавок углеводов (ЕМВ0), минимальный агар VB (разд. 14.4.6) + 0,5% галактозы (МА+Gal) (и любые другие добавки, требуемые для роста данного реципиента) и водный раствор 10 мМ MgCl₂ (или MgSO₄).

Приготовление лизата трансдуцирующего фага

Лизат трансдуцирующего фага легче всего приготовить следующим образом: сначала лизогенизировать донорный штамм фагом λ c1857, а затем вызвать его лизис.

1. Выращивают несколько миллилитров культуры донора в супер-бульоне при 37 °С до титра, приблизительно равного $1 \cdot 10^8$ — $2 \cdot 10^8$ клетка/мл.

2. Добавляют около 200 мкл этой культуры к 2 мл расплавленного мягкого лямбда-агара, находящегося при 45 °С, и немедленно выливают содержимое на по-

верхность лямбда-агара в чашке. Быстрыми движениями вперед-назад смесь с мягким агаром равномерно распределяют по чашке и оставляют на несколько минут при комнатной температуре до затвердения нанесенного слоя агара. (Чашки с лямбда-агаром нужно довести до комнатной температуры или даже слегка подогреть, так как на холодном нижнем слое агара мягкий агар может затвердеть еще до того, как он равномерно распределится по поверхности.)

3. В центр чашки наносят две капли λ c1857-фаголизата, в которых содержится 10^9 — 10^{10} пятнообразующих единиц (ПОЕ) в 1 мл. (Если λ -фаголизат хранился над хлороформом, то остатки последнего перед использованием удаляют инкубацией проб при 37°C с пропусканием время от времени пузырьков воздуха до тех пор, пока не будут больше выявляться пары хлороформа.) Крышку чашки Петри оставляют слегка приоткрытой до того момента, как нанесенные капли впитаются в агар. Чашку переворачивают и инкубируют при 30°C в течение ночи. На следующий день на поверхности агара вырастает сплошной бактериальный газон с большим пятном в центре, вызванным лизисом некоторых клеток, инфицированных фагом λ c1857. Центр этого пятна, однако, будет замутнен вследствие выживания и роста донорных клеток, которые лизогенизировались фагом λ c1857.

4. Стерильной зубочисткой, деревянной палочкой или петлей отбирают некоторые колонии из замутненных областей роста в центре пятна и вносят их в супер-бульон (10 мл), находящийся в стерильной колбе Эрленмейера объемом 125 мл.

5. Инкубируют эту культуру при 30°C со встряхиванием и вращением колбы, чтобы добиться хорошей аэрации. Когда концентрация культуры достигает примерно $2 \cdot 10^8$ клетка/мл, увеличивают температуру инкубации до 45°C на 1—2 мин и затем вновь снижают до 37°C . Продолжают инкубацию с аэрацией приблизительно 2 ч; за это время лизис должен пройти полностью.

6. Добавляют каплю CHCl_3 , энергично встряхивают, чтобы она хорошо диспергировалась, и продолжают встряхивание при 37°C в течение 10—15 мин.

7. Остатки бактерий удаляют из лизата центрифугированием при 6000—7000 g в течение 5—10 мин. Над-

осадочную жидкость сливают в стерильную колбу или пробирку с завинчивающейся крышкой и добавляют еще одну каплю CHCl_3 .

Определение титра фага

Полученный λ c1857-фаголизат должен иметь титр около 10^{10} ПОЕ/мл; точно его определяют следующим образом.

1. Выращивают культуру в объеме 10 мл — либо нелизогенного штамма-донора, либо штамма-реципиента — в супер-бульоне с аэрацией пропусканием пузырьков воздуха или встряхиванием при 37°C до титра $1 \cdot 10^8$ — $2 \cdot 10^8$ клетка/мл.

2. Осаждают клетки культуры центрифугированием при 6000—7000 g в течение 5—10 мин и осадок суспендируют в 10 mM MgCl_2 .

3. Вновь осаждают клетки так же, как и на этапе промывания, и суспендируют осадок в 10 мл 10 mM MgCl_2 .

4. Оставляют суспензию в стерильной колбе Эрленмейера при 37°C в режиме голодания на 60 мин со встряхиванием.

5. Вносят в стерильные пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм аликвоты суспензии объемом 1,9 мл и инкубируют их при 37°C .

6. Делают последовательные десятикратные разведения λ -фаголизата раствором 10 mM MgCl_2 .

7. Добавляют в пробирки с находящимися в них при 37°C аликвотами бактериальной суспензии по 100 мкл одного из следующих разведений лизата: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . После 10—15-мин преадсорбции отбирают из каждой пробирки по 200 мкл и смешивают с 2 мл расплавленного мягкого лямбда-агара, имеющего температуру 45°C . Немедленно выливают получившуюся смесь на поверхность лямбда-агара в чашке, как описано выше.

8. После того как мягкий агар затвердеет, чашки переворачивают и инкубируют при 37°C .

Целесообразно дублировать посев каждого разведения на тот случай, если в одной из чашек произойдет размазывание из-за избытка влаги. Надежнее всего

титр определяют по результатам учета в чашках, где имеется не менее 50, но не более 400 стерильных пятен. Титр равен среднему числу пятен на чашке, умноженному на 100 и на величину, обратную тому разведению, по которому производили подсчет пятен. В случае определения титра лизата трансдуцирующего фага целесообразно отбирать и высевать некоторое количество лизата на чашку с агаром EMB + Gal, чтобы убедиться в отсутствии жизнеспособных клеток донора.

Описание метода специфической трансдукции

1. Выращивают реципиентный штамм с мутацией по гену *gal* в 10 мл супер-бульона при 37°C с аэрацией посредством пропускания пузырьков воздуха или встряхивания до титра $2 \cdot 10^8$ — $4 \cdot 10^8$ клетка/мл.

2. Осаждают, промывают и суспендируют клетки в 10 мл 10 mM $MgCl_2$; аэрируемые клетки оставляют голодать при 37°C в течение 60 мин перед инфицированием.

3. Вносят аликвоты этой культуры (0,9 мл) в стерильные пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм и инкубируют при 30°C.

4. Делают такие разведения лизата трансдуцирующего фага в 10 mM $MgCl_2$, чтобы добавление 100 мкл к 0,9 мл бактериальной суспензии приводило к численным соотношениям, равным 0,1, 1,0 и 3,0 фага на одну бактерию. Остатки $CHCl_3$ удаляют из лизата пропусканием через него потока воздуха

5. Добавляют полученные разведения к пробам реципиентных клеток объемом 0,9 мл; одну такую пробу оставляют как контроль неинфицированной, чтобы убедиться в стабильности мутации по гену *gal* реципиента и в том, что число Gal^+ -трансдуктантов превосходит число Gal^+ -ревертантов, обязательно появляющихся в тех или иных количествах.

6. После 10—15-мин предварительной адсорбции отбирают из каждой пробы 100 мкл и наносят на поверхность агара MA + Gal в каждую из четырех чашек. Для каждого варианта инфекции две чашки инкубируют при 30°C, а две другие — при 37°C.

7. Инкубируют чашки двое суток и затем подсчитывают число колоний с фенотипом Gal^+ .

Характеристика свойств трансдуктантов

Для того чтобы охарактеризовать трансдуктанты, их следует отобрать и очистить, как это было описано выше. Обычно для этого используют агаровые среды МА+Gal, ЕМВ+Gal среду Мак-Конки+Gal. Чашки инкубируют при 30°C. В качестве последнего этапа отбирают отдельные колонии каждого трансдуктанта в 2 мл супер-бульона и выращивают культуру при 30°C до концентрации $1 \cdot 10^8$ — $2 \cdot 10^8$ клетка/мл. Клоны Gal⁺, если их образование вызвано трансдукцией, должны обладать несколькими свойствами, выявление которых проводится следующим образом.

1. Трансдуктанты должны быть лизогенны по отношению к дефектным и недефектным производным фага λ c1857, и поэтому они не должны расти при 37 или 42°C. Чтобы проверить это, из каждой культуры отбирают петлей пробу, наносят ее на агар ЕМВ+Gal в чашке и инкубируют при 37 или 42°C. В качестве контроля инкубируют пробу при 30°C.

2. Трансдуктанты должны быть невосприимчивы к фагу λ . Это определяют перекрещивающимся посевом. Около 50 мкл лизата фага λ c1857 равномерно полосой наносят ниже центра в чашку с агаром ЕМВ0. Через 5—10 мин, когда лизат впитается в агар, наносят полосой взятую петлей чистую культуру трансдуктанта Gal⁺ таким образом, чтобы она пересекала фаговую полосу. Контролями для этого теста служат штаммы донора и реципиента. Чашки инкубируют при 30°C. Рост неинфицированных контрольных бактерий в стороне от фаговой полосы определяют по окраске от белой до розовой в чашках с агаром ЕМВ0. Чувствительность к фагу λ выявляют по ярко-красному окрашиванию выживших бактерий в месте пересечения фаговой полосы с полосой чувствительного к фагу штамма. Изменение цвета обусловлено продукцией или освобождением кислоты вследствие лизиса части бактерий. Таким образом, агар ЕМВ0 — очень тонко реагирующий индикатор на чувствительность бактерий к умеренным фагам, которые не лизируют все инфицированные клетки.

3. Трансдуктанты должны быть частично диплоидны и гетерозиготны, поскольку они имеют как gal⁺, так и

gal⁻-гены. Это определяют следующим способом. Разводят культуру таким образом, чтобы при распределении 100 мкл по поверхности агара ЕМВ+Gal в чашке после инкубации при 30°C выросло 100—300 колоний. Если трансдуктанты частично диплоидны и гетерозиготны, то приблизительно 1—3% колоний выглядят как отрицательные по сбраживанию и имеют окраску от белой до розовой, а остальные положительные по сбраживанию колонии окрашены в темно-фиолетовый или черный цвет. Возникновение фенотипов Gal⁻ происходит вследствие рекомбинации, приводящей к гомозиготности по признаку *gal*, исходно имеющемуся у реципиента.

4. Большинство трансдуктантов Gal⁺, возникших при низкой множественности заражения, будут нести лишь геном λ *gal*-трансдуцирующего фага; некоторые из них можно проанализировать, проинкубировав культуру при 37°C, с тем чтобы выяснить, высвобождаются ли при этом инфекционные частицы фага λ . Это делают следующим образом: 1) разводят культуру выделенных трансдуктантов 1:10 в 1—2 мл супер-бульона в пробирках диаметром 13 и высотой 100 мм; 2) инкубируют пробирки при 37°C в течение 2 ч; 3) добавляют каплю СНСl₃, чтобы убить выжившие бактерии; 4) наносят отобранный петлей лизат в чашки с агаром ЕМВ0 или лямбда-агаром и сверху наслаивают 2 мл мягкого лямбда-агара, к которому предварительно добавляют 100—200 мкл культуры, находящейся в логарифмической фазе роста бактерии, чувствительной к фагу λ , и 5) чашки инкубируют в течение ночи при 37°C. Скорее всего исследуемые Gal⁺-трансдуктанты будут содержать частицы фага λ с геномом *dgal* и окажутся не способными образовывать фаговые частицы, лизирующие индикаторный штамм, чувствительный к фагу λ . Это вызвано тем, что гены фага λ , необходимые для литической реакции, заменены генами *gal*⁺.

5. Большинство Gal⁺-трансдуктантов, образующихся при множественном заражении, являются двойными бактериями-лизогенами, содержащими как профаг дикого типа λ c1857, так и профаг с геномом *dgal*. Инкубация культур этих трансдуктантов при 37°C приводит к спонтанному лизису с высвобождением смеси приблизительно равного количества частиц фага λ c1857, которые

способны образовывать стерильные пятна, и фага λ *dgal*. Способность к образованию пятен в этих лизатах проверяют методом, описанным выше. Такие лизаты имеют высокую концентрацию частиц λ *gal* и могут трансдуцировать с образованием типа Gal^+ 10—50% реципиентов с мутацией по гену *gal*. В этом можно убедиться повторной трансдукцией, проводя ее так, как описано выше (разд. 14.2.1), с той лишь разницей, что инфекционную смесь разводят (10^{-3} — 10^{-5}) перед посевом в чашки с агаром $\text{MA} + \text{Gal}$. Полученные лизаты были названы трансдуцирующими с высокой частотой (HFT) в противоположность лизатам, трансдуцирующим с низкой частотой (LFT), которые образуются при первоначальной индукции при 37°C донорного штамма лизогенной бактерии, содержащей профаг λ *c1857*.

Применение

Специфическая трансдукция облегчает генетические исследования у бактерий, касающиеся, в частности, расположения и регуляции генов. Для *E. coli* существует множество фагов, подобно фагу λ включающихся в хромосому бактерии в разных местах и позволяющих осуществлять специфическую трансдукцию хромосомных маркеров. Очень важно при этом, какой используется донор-хозяин. Например, штамм 2 (табл. 14.1) имеет делецию в месте нормальной интеграции профага λ ; в этом случае фаг λ включается с низкой частотой в другие, несвойственные для него места, разбросанные по всей хромосоме. Индукция таких лизогенных бактерий приводит к формированию трансдуцирующих фагов, несущих почти любой желаемый ген [35]. Этот подход может быть использован и для других фагов *E. coli*, осуществляющих специфическую трансдукцию, а также для фагов, размножающихся в других видах бактерий. Многие из методов, позволяющих реализовать эти подходы и другие возможности использования фагов, способных к специфической трансдукции, описаны Миллером [2].

14.2.2. Общая трансдукция (*E. coli* — бактериофаг P1)

Штаммы бактерии и фага

Бактериофаг P1 представляет собой вирус, осуществляющий общую трансдукцию на чрезвычайно широком круге хозяев. Не представляет труда выделить мутант фага P1, который с большой эффективностью размножается приблизительно на 70% штаммов *E. coli*, полученных из клинического материала, а также мутанты, легко инфицирующие штаммы родов *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Citrobacter* [17].

Благодаря этому свойству, а также тому, что фаг P1 может трансдуцировать фрагменты донорной ДНК, по мол. массе доходящие до $60 \cdot 10^6$, этот трансдуцирующий фаг очень полезен. Однако по сравнению с другими часто используемыми колифагами фаг P1 медленней адсорбируется на бактериях, образует очень маленькие стерильные пятна и дает лизаты, которые стабильны только при условии, что абсолютно лишены остатков бактериальных клеток. Фаг P1 *kc* [24], являющийся производным фага P1, с высокой эффективностью заражает штамм *E. coli* K-12 и образует относительно прозрачные стерильные пятна, что облегчает его определение. Однако P1 *kc* способен лизогенизировать бактерию-хозяина. Фаг P1 L4 [8] представляет собой мутантную форму фага P1 *kc* с мутацией в гене репрессора *CI*, которая делает его не способным к лизогенизации.

Несмотря на то что для трансдукции фагом P1 могут быть использованы многие донорные и реципиентные штаммы *E. coli* K-12, принципы работы с ним удобно показать на системе, позволяющей простую демонстрацию совместной трансдукции (котрансдукции). Для этого донорный штамм (штамм 7, табл. 14.1) должен иметь мутацию *lacZ*, обуславливающую неспособность синтезировать β -галактозидазу и, следовательно, невозможность использования лактозы в качестве источника углерода. Реципиент (штамм 8, табл. 14.1) должен обладать генотипом *lacZ*⁺*proC*, чтобы при отборе трансдуктантов по *proC*⁺ некоторые из них могли иметь наследуемую мутацию донора *lacZ*, трансдуцирующуюся совместно с мута-

цией *proC*⁺. Эти два гена котрансдуцируются примерно в 30% случаев. Для описанного эксперимента подходит фаг P1 *kc* независимо от того, способен он лизогенизировать реципиентный штамм или нет.

Среды

Для выращивания бактерий, приготовления лизата и определения фага P1 используют L-бульон, L-агар (1,2% агара) и мягкий L-агар (0,65% агара), содержащий 2,5 мМ CaCl₂; для бактериальных проб — агар Penassay и для отбора трансдуктантов — среду VB-E, дополненную 1% лактозы, 0,4% двузамещенного янтарнокислого натрия и 50 мкг/мл трифенилтетразолийхлорида. На последней среде трансдуктанты *lac*⁺*proC*⁺ имеют белые колонии, а трансдуктанты *lacZproC*⁺ способны расти благодаря наличию сукцината как источника углерода, образуя колонии красного цвета. Цитрат-ион, находящийся в среде VB-E, связывает Ca²⁺, требуемый для адсорбции фага P1, и поэтому заражение этим фагом бактерий на селективной среде сводится к минимуму. Методы приготовления сред см. в разд. 14.4.

Определение титра фага

1. Добавляют 1 мл 12-час культуры (выращенной в L-бульоне в отсутствие CaCl₂ без принудительной аэрации; см. 1-й этап в «Осуществлении трансформации» в разд. 14.1.4) P1-чувствительного штамма донора к 9 мл L-бульона, содержащего 2,5 мМ CaCl₂.

2. Далее аэрацию культуры обеспечивают посредством пропускания пузырьков воздуха или встряхиванием при 37°C в течение 60—90 мин до тех пор, пока культура не достигнет титра, приблизительно равного $2 \cdot 10^8$ клетка/мл.

3. Пока культура растет, делают разведения (10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7}) L-бульоном, содержащим 2,5 мМ CaCl₂, фаголизата P1 L4 (или P1 *kc*), титр которого должен быть равен 10^{10} ПОЕ/мл.

4. Аликвоты выращенной культуры P1-чувствительного штамма объемом 1,9 мл разливают по пробиркам диаметром 13 и высотой 100 мм при 37°C.

5. После нескольких минут, требуемых для уравнивания температуры, добавляют из каждого разведения фаголизата Р1 100 мкл и оставляют на 20—30 мин, чтобы произошла адсорбция фага на бактериальных клетках.

6. Вносят по 200 мкл полученной смеси в 2 мл мягкого L-агара и немедленно выливают на поверхность L-агара, содержащего 2,5 мМ CaCl_2 . Через 5 мин чашки переворачивают и инкубируют при 37°C.

Стерильные пятна становятся видимыми через 6 ч инкубации; их диаметр варьирует в пределах 0,5—1 мм. Чашки с пробами на Р1 L4 можно инкубировать перед подсчетом в течение ночи, а на Р1 *kc* — порядка 6 ч, так как в случае инкубации, продолжающейся всю ночь, из-за роста лизогенизированных клеток в центре чашки пятна становятся мутными и трудно различимыми. Титр фага равен числу пятен, умноженному на 100 и на величину, обратную соответствующему разведению.

Приготовление лизата трансдуцирующего фага

1. Выращивают нужный штамм бактериального донора, как это описано выше в «Определении титра фага» (этапы 1 и 2).

2. Фаголизат Р1 L4 (или Р1 *kc*) разводят в L-бульоне с 2,5 мМ CaCl_2 так, чтобы в 1 мл содержалось $6 \cdot 10^7$ — $8 \cdot 10^7$ ПОЕ, и добавляют по 100 мкл лизата к 1,9 мл культуры донора, находящейся в логарифмической фазе (в пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм) при 37°C.

3. Оставляют пробы на 20—30 мин для предварительной адсорбции фага Р1.

4. Из каждой пробы отбирают 200 мкл смеси, добавляют к 2 мл мягкого L-агара + 2,5 мМ CaCl_2 и немедленно разливают по поверхности L-агара + 2,5 мМ CaCl_2 в чашке. Таким способом готовят от пяти до восьми чашек. (На каждую чашку следует засеивать от $6 \cdot 10^5$ до $8 \cdot 10^5$ клеток донора, зараженных фагом Р1 L4 или Р1 *kc*, при избытке незараженных бактерий.) Через 5 мин чашки переворачивают и инкубируют 6 ч при 37°C.

5. Наливают на поверхность агара в каждую чашку 3—5 мл L-бульона, содержащего 10 мМ MgSO_4 (но не CaCl_2). С помощью стеклянного шпателя размельчают

слой мягкого агара и собирают его в центрифужный стакан объемом 40—50 мл из полипропилена (или другого материала, устойчивого к CHCl_3). Добавляют примерно 100 мкл CHCl_3 на каждые 4 мл лизата, плотно закрывают центрифужный стакан и интенсивно перемешивают содержимое в течение 1—2 мин на миксере типа Vortex. Стакан оставляют на 2 ч при комнатной температуре или на ночь в холодильнике, чтобы фаг P1 успел продиффундировать в водную фазу. Время от времени перемешивание можно повторять.

6. Неочищенный лизат центрифугируют при 5000—6000 g в течение 10—15 мин и осторожно декантируют надосадочную жидкость в колбу или пробирку с завинчивающейся крышкой. Добавляют к полученному лизату несколько капель CHCl_3 и энергично встряхивают. Хранят лизат при 4°C.

На следующий день определяют титр лизата, как это было описано ранее, и проверяют его стерильность посевом небольшого количества в чашку с L-агаром или агаром Penassay. Такие лизаты относительно стабильны, но за год при температуре хранения 4°C их титр может упасть на 1—2 порядка. Полной стабильности фаголизата P1 достигают фракционированием в градиенте CsCl с последующим удалением CsCl диализом против L-бульона + 10 mM MgSO_4 [8].

Создание бактерий, лизогенных по фагу P1_{kc}

Когда эксперименты по трансдукции проводят с целью количественной оценки частоты генов в клетках-донорах, котрансдукции и др., целесообразно использовать реципиентные штаммы, лизогенные по фагу P1_{kc}. В тех же случаях, когда трансдукцию применяют для создания штаммов, это нежелательно. Лизогенные реципиентные штаммы создают следующим образом.

1. Выращивают нужный реципиентный штамм, как описано выше в «Определении титра фага» (этапы 1 и 2).

2. Вносят по 0,9 мл культуры в пробирки размером 13×100 мм и оставляют при 30°C на 5 мин для уравнивания температуры.

3. Добавляют 0,1 мл фаголизата Р1 *кс* с таким расчетом, чтобы на одну бактерию приходилось 3 ПОЕ. Если лизат не разводился по крайней мере в 10 раз, нужно быть уверенным в отсутствии следов CHCl_3 , что необходимо для предотвращения гибели клеток реципиента.

4. Инкубируют при 30°C 2—3 ч. При инфекции фагом Р1 лизогенизации благоприятствует пониженная температура (20—30°C), а литической реакции — высокая температура (37—42°C).

5. Для получения отдельных колоний делают посев культуры штрихом в чашку с агаром Penassay или L-агаром или обычный посев соответствующего разведения.

6. Отбирают и очищают 10 хорошо обособленных колоний (нерастекающихся и с правильными гладкими краями) на L-агаре, применяя общие методы, описанные в 10-м этапе «Осуществления трансформации» в разд. 14.1.3.

7. Отбирают хорошо обособленную колонию каждого из 10 изолятов в пробирку диаметром 13 и высотой 100 мм, содержащую 2 мл L-бульона + 1 мМ цитрат (без CaCl_2). Пронумерованные 10 культур инкубируют при 42°C 4—6 ч до получения концентрации примерно $2 \cdot 10^8$ клетка/мл. При 42°C увеличивается скорость спонтанной индукции бактерий, лизогенных по фагу Р1, а благодаря отсутствию ионов Ca^{2+} фаг Р1, высвобождаемый вследствие спонтанной индукции, накапливается.

8. Проверяют, действительно ли предполагаемые бактерии, лизогенные по фагу Р1, высвободили его во время роста при 42°C.

а) Вносят по 1 мл каждой из десяти культур и 1 мл культуры исходного Р1-чувствительного штамма (в качестве контроля) в пронумерованные пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм при 42°C.

б) В каждую пробирку добавляют каплю CHCl_3 , встряхивают и продолжают инкубировать в течение 15—20 мин.

в) Делают последовательные десятикратные разведения фаголизата Р1 *кс* от 10^{-1} до 10^{-8} .

г) Добавляют 200 мкл культуры Р1-чувствительного штамма, выращенного в L-бульоне + 2,5 мМ CaCl_2 и находящегося в логарифмической фазе, к 2 мл расплавленного мягкого L-агара + 2,5 мМ CaCl_2 . Выливают агар в чашку с агаром ЕМВ0 + 2,5 мМ CaCl_2 и дают слою мягкого агара затвердеть.

д) Наносят максимально наполненной петлей на поверхность мягкого агара одной чашки с ЕМВ0 пробы из одиннадцати обработанных хлороформом культур и восьми последовательных разведений фага Р1. Чтобы высвободить все содержимое, взятое петлей, ее краем прикасаются к поверхности агара. Крышку чашки Петри оставляют приоткрытой до тех пор, пока нанесенный материал не впитается в мягкий агар. На дне чашки отмечают положение всех нанесенных проб.

е) Лучше всего инкубировать чашку с ЕМВ0 неперевернутой при 37 или 42 °С в течение ночи.

Области лизиса (сплошного или в виде пятен) должны наблюдаться для каждого обработанного хлороформом экстракта, приготовленного из клеток, лизогенных по фагу Р1, означая тем самым, что во время роста при 32 °С высвободилось достаточное количество фага Р1. Нанесения разведений лизата Р1 дают представление о чувствительности метода.

9. Проверяют, устойчивы ли к фагу Р1 клетки, лизогенные по этому фагу.

а) Наносят 50—100 мкл фаголизата Р1 L4 (содержащего $\sim 10^{10}$ ПОЕ/мл) ниже центра чашки с агаром ЕМВ0+2,5 мМ CaCl₂. Оставляют крышку приоткрытой, пока нанесенная полоса не подсохнет. Размечают на дне чашки направление и расположение всех полос.

б) Набирая каждый раз по полной петле, делают посев в виде полос, пересекающих полосу лизата всех десяти культур, как предполагают лизогенных по фагу Р1, и культуры жизнеспособного Р1-чувствительного исходного штамма.

в) Дают полосам подсохнуть. Переворачивают чашки и инкубируют их при 37 °С в течение ночи.

Выделенные бактерии, устойчивые к фагу Р1 L4 и высвобождающие фаг Р1 *kc* во время роста при 42 °С, можно использовать как источник клеток, лизогенных по фагу Р1 *kc*. Клетки, лизогенные по фагу Р1, проявляют нестабильность, по-видимому, из-за того что профаг Р1 существует в клетке в виде плазмиды, которая иногда теряется. Поэтому после ряда пересевов культур, лизогенных по фагу Р1, может понадобиться их повторное выделение, для которого используют процедуры и проверки, перечисленные выше. Рост лизогенных бактерий в присутствии 2,5 мМ CaCl₂ при 37 °С также приводит к спонтанному высвобождению фага Р1, инфицирующего нелизогенную часть культуры, клетки которой либо лизируются, либо повторно становятся лизогенными.

Метод общей трансдукции

Когда используют нелизогенный реципиент, множественность заражения обычно составляет 1 или немного меньше; при этом клетки, зараженные частицами трансдуцирующего фага P1, уже не заражаются другими частицами того же фага и поэтому не теряются вследствие лизиса. Поскольку адсорбция фага P1 протекает не очень быстро (при 37°C за 20—30 мин, прошедшие после введения, к клеткам прикрепляется только 30—50% фага), исходное количество фаговых частиц берут из расчета 2—3 на одну бактерию; тогда множественность эффективного заражения будет равна 1. В случае использования лизогенного реципиента при повторном заражении клеток фагом выход трансдуктантов не снижается, так как лизогенные клетки иммунны к суперинфицированию фагом P1 L4. Чтобы убедиться в этом, можно добавить P1 L4-лизат родителя-донора к нелизогенному и лизогенному штаммам из расчета 0,5, 2,5 и 12,5 фаговых частиц на одну бактерию. Последней, наибольшей, множественности заражения достичь довольно трудно, если лизат имеет титр 10^{10} ПОЕ/мл. Трансдукцию в этих случаях осуществляют следующим образом.

1. Выращивают лизогенный и нелизогенный по фагу P1 *kc* реципиентные штаммы *lacZ⁺ proC* до плотности $2 \cdot 10^8$ клетка/мл, как описано выше в «Определении титра фага» (разд. 14.2.2).

2. Пока выращивают реципиентные штаммы, некоторое количество P1 L4-лизата донора *lacZ proC⁺* аэрируют при 37°C для удаления остатков CHCl_3 . В это же время рассчитывают объем разведенного или неразведенного лизата (обычно 0,1—0,5 мл), который при добавлении к отобранному объему реципиентных клеток с концентрацией $\sim 2 \cdot 10^8$ клетка/мл (обычно 0,5—1,9 мл) дает 12,5 ПОЕ на одну бактерию. Затем разводят лизат P1 L4 в L-бульоне, содержащем 2,5 мМ CaCl_2 , так чтобы при добавлении фиксированного объема лизата к фиксированному объему реципиентных клеток на одну бактерию приходилось 0,5, 2,5 и 12,5 ПОЕ.

3. Вычисленные объемы бактериальной культуры каждого из реципиентных штаммов вносят в четыре пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм и ставят все во-

семь культур инкубироваться при 37°C. Определяют титры реципиентных культур посевом соответствующих разведений на L-агар или агар Penassay.

4. Добавляют вычисленный объем донорского лизата P1 L4 к трем из четырех культур каждого реципиентного штамма и равный объем L-бульона + 2,5 мМ CaCl₂ к четвертой культуре, которая служит контролем. Инфицировать культуры лучше всего с 3-мин интервалом.

5. После предварительной адсорбции фага в течение 30 мин ко всем пробам, содержащим смесь фаговых частиц бактерий, добавляют 100 мкл 0,2 М лимоннокислого натрия для хелатирования ионов Ca²⁺ и остановки дальнейшего инфицирования фагом P1.

6. Вносят аликвоты неразведенных и разведенных в 10 раз проб каждой инфицированной и неинфицированной культуры (100 мкл) в чашки с минимальным агаром VB, содержащим лактозу, соли янтарной кислоты и трифенилтетразолийхлорид. Чашки инкубируют 2 сут при 37°C и затем подсчитывают колонии.

7. Для определения титра выживших клеток делают посев соответствующих разведений зараженных и незараженных культур на L-агар или агар Penassay. Чашки инкубируют при 37°C в течение ночи.

8. Вновь определяют титр P1 L4-лизата методом, описанным выше в «Определении титра фага». Это особенно важно при работе с вновь приготовленными лизатами P1, так как иногда в течение первой недели титр возрастает в 2—3 раза в результате вызванной хлороформом дезагрегации фаговых частиц, слипающихся из-за присутствия обрывков бактериальных клеток и (или) мельчайших кусочков агара.

9. Чтобы убедиться в отсутствии жизнеспособных клеток донора в лизате P1 L4, делают посев 100 мкл последнего на селективный минимальный агар VB.

Когда используют лизогенный по фагу P1 *ks* реципиентный штамм, число трансдуктантов пропорционально титру взятого фага, в то время как в случае нелизогенного реципиента число трансдуктантов должно быть меньше при множественности заражения большей единицы, чем при множественности заражения, меньшей или равной единице. В обоих случаях частота котрансдукции *lacZ* и *proC*⁺ должна быть одной и той же в

пределах ошибки измерений. Если использовать распределение Пуассона по частоте гибели клеток нелизогенного реципиента для каждого инфицирования, то можно определить фактическую множественность заражения [4].

Применение

Общая трансдукция сыграла большую роль в определении точного расположения генов в бактериальной хромосоме. С этой целью были использованы штаммы, имеющие помимо маркера, по которому вели отбор, два или три других наследуемых аллеля. С подобными штаммами осуществляли трансдукцию со всеми возможными взаимными комбинациями отбираемого и неотбираемых маркеров. Для создания штаммов с желаемым генотипом использовали также трансдукцию, опосредуемую фагом P1. Мутантный аллель с известными свойствами можно котрансдуцировать в какой-либо штамм, ведя отбор по наследованию прилежащего маркера дикого типа. Если котрансдукция невозможна, то мутантные аллели можно ввести трансдукцией фагом P1 и — после сегрегации и фенотипической экспрессии — накопить соответствующие клетки ампициллин-циклосериновым обогащением. Более новым и более изящным является метод, основанный на переносе факторов устойчивости к лекарственным препаратам (ФУЛП) [7]; в этом случае способ отбора клеток, как имеющих, так и не имеющих индуцированные мутации, основан на инактивации генов за счет вставки при переносе ФУЛП. С помощью модификации этой методики можно располагать способные к переносу ФУЛП в локусах, прилежащих к аллелю дикого типа или мутировавшему аллелю данного гена, и передавать этот аллель от одного штамма другому.

Еще один полезный метод, разработанный Хонгом и Эймсом [20], позволяет индуцировать мутации в неизвестных генах, тесно сцепленных с известными. Обработкой трансдуцирующего фаголизата азотистой кислотой, гидроксиламином или нитрозогуанидином с последующим отбором при 30°C трансдуктантов, в которых наследуется известный аллель дикого типа, можно с высо-

кой частотой получать мутации в генах, определяющих температурочувствительные дефекты в некоторых жизненно важных функциях, причем за эти функции ответственны гены, соседние с аллелем, по которому ведется отбор.

С помощью трансдукции, опосредованной фагом P1, можно также определить, является тот или иной признак хромосомным или плазмидным по своему происхождению. P1-Фаголизат, полученный из донорных клеток, облучают возрастающими дозами ультрафиолета, и облученные и необлученные лизаты используют для трансдукции реципиентному штамму, который затем подвергают отбору на интересующий наследуемый признак донора. Если признак детерминируется хромосомным геном, то малые дозы ультрафиолета будут увеличивать общее число трансдуктантов, так как ультрафиолет повышает частоту рекомбинации; если же признак детерминируется плазмидой, то частота трансдуктантов, наследующих донорский признак, с увеличением дозы ультрафиолета будет уменьшаться, поскольку вызываемые облучением повреждения препятствуют репликации плазмиды после ее переноса в реципиентные клетки путем трансдукции.

Наличие производных фага P1, обладающих способностью переносить ФУЛП, позволяет производить позитивный отбор лизогенных бактерий, присутствующих в относительно малых количествах, и находить новые P1-трансдуцирующие системы среди других представителей энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*) [17]. Можно также отобрать редко встречающиеся производные фага P1 с более выраженной способностью размножаться в клетках данного штамма или мутанты хозяина, в которых фаг P1 размножается лучше, чем на других.

Фаги, осуществляющие общую трансдукцию, известны для множества родов бактерий. Лучше всего изучена система, в которой используются фаг P22 и бактерия *S. typhimurium* [39]. У нее есть определенные преимущества по сравнению с системой P1—*E. coli*, заключающиеся в том, что фаг P22 легко поддается размножению в жидких лизатах, образует большие стерильные пятна и дает лизаты, остающиеся стабильными годами. Важно также, что эта система позволяет анализировать мутант-

ные аллели на способность дополнять друг друга за счет процесса, называемого абортивной трансдукцией [18, 33].

14.3. КОНЬЮГАЦИЯ

Конъюгация — это тип опосредуемого клеткой переноса генов, который требует наличия у клетки-донора конъюгативной плазмиды. Эта плазида может реплицироваться или в цитоплазме синхронно с бактериальной хромосомой, или как часть хромосомы в интегрированном с ней состоянии. Конъюгативные плазмиды обладают генами *tra*, которые определяют и (или) контролируют: 1) образование отростков, называемых донорскими половыми ворсинками, которые обязательны (по крайней мере для большинства конъюгативных плазмид) для осуществления донорными клетками контакта с клетками реципиента; 2) вещества, снижающие частоту конъюгации (спаривания) донора с донором, и 3) конъюгационный перенос плазмидной или хромосомной ДНК, начинающийся с определенного места (точка начала переноса) в молекуле конъюгативной плазмиды. Конъюгативные плазмиды имеют также гены, контролирующие 1) их репликацию, не связанную с половым процессом, 2) число копий плазмид в пересчете на эквивалент хромосомной ДНК и 3) функции несовместимости. В конъюгативных плазмидах могут также находиться гены, отвечающие за другие фенотипические признаки, такие, как устойчивость к антибиотикам, устойчивость к ионам тяжелых металлов, продукция бактериоцинов, поверхностных антигенов и энтеротоксинов. Конъюгативные плазмиды имеются, по-видимому, у всех грамотрицательных бактерий; не так давно они были обнаружены у некоторых видов *Streptomyces* и *Streptococcus*.

Из конъюгативных плазмид лучше всех изучен половой фактор F (фактор фертильности) бактерии *E. coli* K-12. Эта плазида может существовать как автономно в цитоплазме у F⁺-донора, так и в интегрированном состоянии у Hfr-донора. Реципиентные штаммы не имеют фактора F и обозначаются F⁻. F⁺-Доноры передают F-плазмиды практически всем F⁻-клеткам, с которыми они спариваются, но генетическую информацию хромо-

сом они способны передавать лишь с низкой частотой. Все хромосомные маркеры донора F^+ передаются с примерно одинаковой частотой (около 10^{-5} на одну донорную клетку для любого маркера), и большинство образовавшихся трансконъюгантов наследует фактор F. Доноры Hfr передают хромосому направленно и последовательно начиная с генетически фиксированной точки, зависящей от места интеграции фактора F в бактериальной хромосоме. С самыми высокими частотами передаются те генетические маркеры, которые находятся вблизи точки начала переноса Hfr-хромосомы; по мере удаления маркеров от этой точки частота их переноса и наследования пропорционально уменьшается. Такая картина наблюдается вследствие спонтанного случайного прекращения передачи хромосомы. За исключением редких случаев достаточно длительной конъюгации, когда возможен перенос всей Hfr-хромосомы, большинство трансконъюгантов, унаследовавших хромосомный материал Hfr, сохраняет генотип F^- , так как части интегрированной F-плазмиды передаются последними в качестве замыкающих маркеров.

Скорость передачи Hfr-хромосомы постоянна при 37°C . Используя клетки штамма F^- в большой концентрации и прерывая конъюгацию на последовательных этапах, можно определить время, необходимое для переноса любого маркера, и интервал времени, проходящий между переносом последовательно передающихся маркеров. Проводя опыты по конъюгации с Hfr-клетками при 37°C , удалось определить, что перенос всей хромосомы *E. coli* занимает 100 мин; при этом скорость передачи ДНК составляет $\sim 26 \cdot 10^6$ дал/мин. F-Плазида в данном случае, подобно другим конъюгативным плазмидам, содержит так называемые IS-последовательности (от англ. insertion sequences), которые присутствуют и в хромосоме *E. coli*. Именно взаимное узнавание этих последовательностей с последующей рекомбинацией позволяет фактору F определенным образом встраиваться в хромосому *E. coli* [7]. Генетическими методами было идентифицировано около 25—30 мест интеграции фактора F, что привело к созданию Hfr-доноров с разным началом и направлением переноса хромосомы [13, 27].

Более полное обсуждение процесса и механизма

конъюгации можно найти в различных обзорах [3, 11, 12, 38], а также в учебниках и монографиях [16, 18, 21, 25]. С методами осуществления конъюгационных скрещиваний, помимо приведенных ниже, можно ознакомиться в руководствах Клоуса и Хэйеса [1] и Миллера [2].

Общие методы

Поскольку цель экспериментов по конъюгации заключается в выделении трансконъюгантов, обладающих признаками как донора, так и реципиента, следует использовать штаммы с генетическими маркерами, легко поддающимися отбору. В экспериментах по изучению кинетики конъюгационного переноса важно уметь останавливать процесс конъюгации через точные интервалы времени и предотвращать дальнейшее его течение на селективной среде; эта проблема возникает при высевах клеток донора и реципиента с высокой плотностью. Простейший способ достичь этой цели — использовать реципиентный штамм, устойчивый к налидиксовой кислоте благодаря мутации в гене *nalA*. Налидиксовая кислота ингибирует конъюгационный перенос ДНК, и при ее добавлении к смеси конъюгирующих бактерий, состоящей из чувствительного к этой кислоте донора и устойчивого реципиента, перенос как плазмидной, так и хромосомной ДНК немедленно останавливается. Для этого же были использованы реципиентные клетки, устойчивые к рифампицину вследствие мутации в гене *rpoB*, но рифампицин не вызывает мгновенной остановки конъюгационного переноса ДНК. Он останавливает транскрипцию генетической информации донора, что крайне полезно при попытке выявить происходящий с низкой частотой перенос плазмиды, определяющей устойчивость к лекарственным препаратам, таким, как ампициллин, так как продолжающийся в доноре синтез β -лактамазы приводит к инактивации включенного в среду ампициллина и препятствует выявлению трансконъюгантов типа Ar^r .

Большинство конъюгативных плазмид природных штаммов бактерий репрессированы в отношении экспрессии донорного фенотипа, так что лишь одна из 1000—10 000 клеток, имеющих такую плазмиду, способна в оптимальных условиях передавать ее. Но, поскольку

при передаче в реципиентную клетку в некоторых случаях происходит временная депрессия, для выявления переноса конъюгативной плазмиды иногда требуется проводить спаривание в течение нескольких часов или больше и периодически делать разведения смеси конъюгирующих бактерий для поддержания соответствующих плотностей. Выделены мутанты, у которых конъюгативные плазмиды депрессированы; генетическими донорами практически могут быть все донорные клетки таких мутантов, содержащих конъюгативную плазмиду. F-Плазмида — одна из наиболее охарактеризованных депрессированных конъюгативных плазмид.

Хотя некоторые плазмиды стимулируют конъюгационный перенос ДНК в условиях контакта клеток в жидкой среде, другие более эффективны в этом отношении при спаривании клеток донора и реципиента на агаре или на мембранном фильтре, лежащем на питательной агаровой среде. В последнем случае на питательный агар обычно наслаивают питательный мягкий агар и чашки инкубируют в неперевернутом виде нужный период времени, после чего фильтр перекалывают на чашку с селективным агаром, на котором не способны расти клетки-доноры. Можно поступить иначе: погрузить фильтр в солевой буфер и удалить с него клетки периодическим встряхиванием в смесителе типа Vortex, после чего засеять соответствующие разведения на селективную агаровую среду.

Другая варьируемая величина, за которой необходимо следить при определении оптимальных условий конъюгационного переноса, — это температура. Многие конъюгативные плазмиды энтеробактерий переносятся с наибольшей частотой, когда спаривание проводят при температуре 37°C или близкой к ней. Для некоторых из них перенос идет при 25°C, но его трудно выявить, и, если оставить культуры донора перед смешиванием с клетками реципиента на некоторое время при комнатной температуре, это может привести к значительному снижению частоты переноса, происходящего при 37°C. Вместе с тем существуют конъюгативные плазмиды, например в группе IncH, для переноса которых оптимальна температура 25°C, и они хуже переносятся при 37°C. Анализируя возможность передачи признака конъюга-

тивной плазмидой, целесообразно сопоставить течение процесса при 37 и 25 °С.

Рестрикция — это процесс деградации чужеродной ДНК в том случае, когда микроорганизм распознает поступающую в него ДНК как отличную от своей. Иногда рестрикцией объясняется невозможность обнаружения переноса конъюгативных плазмид при внутривидовых, межвидовых и межродовых скрещиваниях. Мутанты, лишенные систем рестрикции (*hsdR* или *hsdS*), имеются у *E. coli* K-12, *S. typhimurium* LT2 и других хорошо охарактеризованных и часто используемых видов бактерий. Даже в отсутствие реципиента, неспособного осуществлять рестрикцию, эта потенциально существующая проблема часто может быть решена прогреванием клеток реципиента перед конъюгацией в течение 5—10 мин при 50 °С или 15—20 мин при 45 °С. Действительно, я наблюдал, что при выращивании в течение 5—7 генераций перед конъюгацией при 42 °С многих реципиентных штаммов *E. coli* более 95% из них становились способными к восприятию конъюгативных плазмид.

14.3.1. Перенос конъюгативных плазмид (F'- или R-плазмид в *E. coli* F-)

Бактериальные штаммы

Изучение переноса конъюгативных плазмид облегчается, если плазида определяет признак, по которому легко вести отбор. F'-Плазмиды (имеющиеся у Hfr-доноров) несут помимо фактора F последовательности хромосомной ДНК, которые примыкали к фактору F, когда он был интегрирован в хромосому. Например, донорные клетки штамма 9 (табл. 14.1), имеющие плазмиду F'*lac*⁺, могут легко передавать признак *lac*⁺ клеткам штамма F⁻, например штамма 10 (табл. 14.1), причем образующиеся трансконъюганты легко отобрать.

Нет трудностей и при изучении переноса R-плазмид. Легко выявляется перенос дерепрессированных производных R-плазмид, таких, как плазида R100 *drd-1* штамма 11 (табл. 14.1), поскольку эта плазида обуславливает устойчивость к тетрациклину (Tc^r) в концентрации 25—50 мкг/мл, хлорамфениколу (Cm^r) в концент-

рации 50 мкг/мл, стрептомицину (Sm^r) в концентрации 50 мкг/мл и сульфаниламиду (Sn^r) в концентрации 25—40 мкг/мл (на синтетической среде). Донор, имеющий плазмиду R100 drd-1, должен быть чувствительным к налидиксовой кислоте, а реципиент, такой, как штамм 10 (табл. 14.1), не должен обладать устойчивостью ни к одному из антибиотиков, устойчивость к которым придает R100 drd-1, и должен иметь мутацию *nalA*.

Среды

Оптимальный рост и максимальную экспрессию фенотипов донора и реципиента обеспечивают и L-бульон, и бульон Penassay. Для титрования культур донора и реципиента можно использовать агар Penassay (с 8 г NaCl в 1 л). Если к нему добавить Tc, Cm или Sm и NaI (разд. 14.4, табл. 14.4), то он годится для отбора трансконъюгантов, содержащих R-плазмиды. Для отбора трансконъюгантов типа Lac^+NaI^r можно применять агар, приготовленный на среде VB-E и дополненный 0,5% лактозы, пролином и налидиксовой кислотой в концентрации 50 мкг/мл. Методы приготовления сред см. в разд. 14.4.

Метод переноса плазмид F'

1. В пробирки диаметром 16 и высотой 125 (или 150) мм, содержащие по 5 мл бульона Penassay, вносят полные петли выращенной на скошенном агаре биомассы каждого типа клеток и инкубируют в течение ночи при 37°C без аэрации.

2. Разводят выросшие культуры 1:100 или 1:200 в 10 и 20 мл предварительно подогретого бульона Penassay. Культуры аэрируют либо пропусканием пузырьков воздуха, либо встряхиванием и выращивают до концентрации $\sim 2 \cdot 10^8$ клетка/мл. Для оптимальной экспрессии фенотипа донора за 30 мин до начала конъюгации аэрацию лучше прекратить, так как рост без аэрации благоприятствует образованию максимального числа и максимальной длины половых ворсинок, детерминируемых

фактором F. Правда, это может относиться не ко всем типам конъюгативных плазмид.

3. В водяную баню с температурой 37°C помещают либо плоскодонные микроколбы Фернбаха на 125 мл, либо 250-мл колбы Эрленмейера, снабженные утяжеляющими свинцовыми кольцами вокруг горлышка, так чтобы уровень воды в бане был немного ниже пробок колб. Свинцовые кольца можно вырезать в форме пончиков из свинцового листа толщиной 6—8 мм. Если нет свинцовых колец, закрепляют колбы таким образом, чтобы они не всплывали и были бы погружены в воду. Погружение колб важно в том случае, когда температура культуры во время конъюгации должна поддерживаться на уровне 37°C.

4. В колбу наливают 9 мл культуры реципиента, чтобы она приняла температуру бани, и определяют ее титр посевом разведения 10^{-6} , равномерно распределяя его по поверхности агара Penassay в чашках. Делают также посев аликвот неразведенной реципиентной культуры объемом 100 мкл на селективную агаровую среду, чтобы убедиться в том, что культура свободна от постороннего материала и содержит небольшое количество ревертантов (или их совсем нет).

5. Через 5 мин добавляют в колбу 1 мл культуры донора и легким вращательным движением смешивают клетки донора и реципиента. Титруют культуру донора и высевают 100 мкл ее на селективную среду. Обращают внимание на то, чтобы общий объем находящейся в колбе жидкости, равный 10 мл, имел высоту слоя 2 мм — это обеспечивает достаточную диффузию кислорода к конъюгирующим клеткам и устраняет необходимость аэрации встряхиванием. Хотя обычно в подобных опытах используют избыток реципиентных клеток, можно брать достаточно широкий интервал отношений клеток донора и реципиента — от 1:20 до 1:1; требуемые отношения получают варьированием объема и (или) плотностей добавляемых в колбу культур донора и реципиента.

6. Через 5-, 10- или 15-мин интервалы в течение 1 ч смесь донорных и реципиентных клеток разводят и высевают аликвоты объемом 100 мкл (50 мкл на чашку) на селективную агаровую среду. При длительности

конъюгации до 30 мин делают конечные разведения 10^{-2} — 10^{-3} , при более продолжительной конъюгации — разведения 10^{-3} — 10^{-4} . Чашки переворачивают и инкубируют при 37°C.

Культуры донора и реципиента, выращенные на комплексных богатых средах, образуют трансконъюганты с большей частотой, чем выращенные на синтетических средах. Однако селекция на синтетических средах трансконъюгантов, которые являются потомками клеток, выращенных и конъюгировавших в бульоне, вследствие худших условий роста приводит к выявлению меньшего числа трансконъюгантов по сравнению с реально образовавшимся. Эту трудность можно преодолеть добавлением 10%-ного (объем/объем) бульона Repassay к среде СБЖ, используемой для разведения смесей конъюгирующих бактерий, так как при добавлении к селективной минимальной агаровой среде небольшого количества бульона способны образовывать колонии все трансконъюганты типа Lac⁺Nal^r.

Частоту образования трансконъюгантов для каждого времени прерывания процесса конъюгации вычисляют делением титра трансконъюгантов в 1 мл смеси на титр донорных клеток в смеси в начале процесса.

Метод переноса R-плазмид

Этапы с 1-го по 5-й те же, что описаны выше для переноса F'-плазмид. Если 6-й этап проводить, как описано выше, то трансконъюганты типов Tc^rNal^r и Cm^rNal^r будут выявляться с большей частотой, чем трансконъюганты типа Sm^rNal^r, особенно при раннем прерывании процесса, а частоты, определенные для всех типов трансконъюгантов, будут ниже тех, которые реально имеют место. Это вызвано тем, что: 1) для экспрессии устойчивости к препаратам, обусловленной R-плазмидами, требуется, чтобы транскрипция и трансляция генов R-плазмид в клетке-реципиенте осуществились до воздействия препаратов; 2) тетрациклин и хлорамфеникол являются бактериостатиками, и поэтому экспрессия устойчивости к этим препаратам может медленно развиваться даже в их присутствии; в то же время стрептомицин бактерициден и вызывает гибель всех трансконъю-

югантов, которые еще не проявили устойчивости к нему. Эти трудности, касающиеся фенотипической экспрессии, возрастают еще больше при работе с R-плазмидами, переносящими устойчивость к ампициллину или канамицину.

Чтобы избежать их и добиться точности в измерении скорости и частоты переноса R-плазмид в каждый из моментов прерывания конъюгации, проводят следующий эксперимент. 100 мкл смеси конъюгирующих клеток и 0,9 мл бульона Penassay, содержащего 50 мкг/мл налидиксовой кислоты, вносят в пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм при 37 °C. Оставляют пробирки на 20—30 мин при 37 °C, а затем разводят пробы и делают посев на селективные среды.

Чтобы убедиться в том, что гены, ответственные за различные типы устойчивости к лекарственным препаратам, действительно передаются одной и той же плазмидой, отбирают около 10 колоний каждого типа транс-конъюгантов стерильными зубочистками и высевают их на другие селективные среды.

Применение

Вышеописанные методики могут использоваться для изучения конъюгационного переноса генов, которые ответственны за кодирование множества признаков, определяемых плазмидами. Конечно, выявление переноса плазмид Col [3] и плазмид, обуславливающих такие признаки, как продукция антигенов и энтеротоксинов [16], требует применения специальных методик, так как прямой отбор по этим признакам невозможен. Некоторые конъюгативные плазмиды способны включаться в бактериальную хромосому с образованием доноров типа Hfr и при исключении из хромосомы могут захватывать часть хромосомной генетической информации, превращаясь в плазмиды типов R', Col' или F'. Такие плазмиды могут использоваться для изучения отношений доминантности — рецессивности, комплементарности между аллелями, а также различных аспектов регуляции генов. Их можно применять и для конструирования штаммов [2]. Эти плазмиды имеют гомологичные с хромосомой участки и их можно применять вместо доноров Hfr

для увеличения подвижности и переноса хромосомных генов в определенном направлении и определенной последовательности [18]. Это особенно полезно в связи с тем, что плазмиды R' , Col' и F' способны активировать хромосомы штаммов (или видов) бактерий, для которых не выделены доноры типа Hfr и которые близкородственны к штамму, из которого были получены плазмиды R' , Col' или F' .

14.3.2. Хромосомный перенос (в *E. coli* F^- от *E. coli* Hfr)

Штаммы бактерий

У *E. coli* выделено множество штаммов типа Hfr с различными точками начала переноса и различными направлениями хромосомного переноса [13, 27]. Выбор штамма Hfr , таким образом, зависит от участка бактериальной хромосомы, который собираются изучать в отношении картирования генетических локусов. Новые Hfr -доноры могут быть легко выделены на различном генетическом фоне с использованием либо модифицированного флукутационного теста со штаммом F^+ [6], либо интегративной супрессии в штамме F^+ или R^+ , имеющем мутацию *dnaA* (Ts) [30]. Методы осуществления скрещиваний типа $Hfr \times F^-$ можно проиллюстрировать, используя какой-либо Hfr -штамм, например прототрофный штамм 12 (табл. 14.1), который передает свою хромосому *O-thr leu proA lac ... pyrB* F^- и чувствителен к налидиксовой кислоте и стрептомицину, и какой-нибудь штамм F^- , например штамм 14 (табл. 14.1), с мутациями, обуславливающими ауксотрофность по лейцину, пролину, аденину, триптофану и тиамину и устойчивость к налидиксовой кислоте и стрептомицину. У штамма 14 имеются и другие мутации, и наследование их аллелей дикого типа будет происходить как наследование маркеров, по которым не ведется отбор. Штамм 13 (табл. 14.1) несет меньше мутаций, чем штамм 14; он более удобен для проверки стабильности Hfr -фенотипа в штамме 12.

Среды

Как L-бульон, так и бульон Penassay обеспечивают оптимальный рост и максимальную экспрессию донорного и реципиентного фенотипов. Для определения титра культур донора и реципиента можно использовать агар Penassay (с добавкой 8 г NaCl на 1 л), а для отбора трансконъюгантов — соответствующим образом дополненную агаровую среду VB-E. Например, трансконъюганты типа Leu^+NaI^r при скрещивании штаммов 12 и 14 можно отобрать на среде, содержащей 0,5% глюкозы, а также пролин, аденин, триптофан, тиамин и налидиксовую кислоту (концентрации добавок см. в табл. 14.4 и 14.5). Для разведения можно брать солевой буфер с желатиной (СБЖ), который дополняют до 10% (объем/объем) бульоном в том случае, когда смесь конъюгирующих клеток, находящуюся в комплексной среде, разводят перед посевом на синтетическую среду. Это небольшое количество бульона обеспечивает питательные вещества для осуществления рекомбинации, равно как и для фенотипической экспрессии признаков донора, и способствует максимальному выходу трансконъюгантов. Методы приготовления сред см. в разд. 14.4.

Проверка стабильности фенотипа Hfr

Поскольку доноры Hfr возникают в результате встраивания конъюгативной плазмиды в бактериальную хромосому, они могут возвращаться к состоянию, при котором эта плазида вновь оказывается в цитоплазме. Поэтому, перед тем как использовать данный штамм в экспериментах по конъюгации, важно убедиться в том, что большая часть клеток популяции Hfr действительно обладает фенотипом Hfr. Это можно сделать как методом перепечатывания с чашки на чашку (метод отпечатков), так и методом отбора и посева штрихом.

Перепечатывание с чашки на чашку

1. Культуру Hfr разводят так, чтобы при высеве на агар Penassay на одной чашке выросло 100 хорошо отделенных друг от друга колоний. Инкубируют 12—16 ч при 37 °C.

2. Наносят 50—100 мкл выращенной в бульоне находящейся в логарифмической фазе культуры F^- штамма 13 (табл. 14.1) на поверхность агара, приготовленного на минимальной селективной среде для отбора трансконъюгантов типа Leu^+Str^r .

3. Перепечатывают колонии Hfr-культуры в чашку с минимальным агаром и нанесенными на него клетками штамма F^- . Фиксируют взаимную ориентацию и расположение колоний с помощью специальных пометок на дне исходной чашки и чашки-копии. Чашки инкубируют 24—48 ч при 37 °C.

4. В случае каждой колонии культуры Hfr, сохранившей Hfr-фенотип, должны быть видны сливающиеся пятна роста рекомбинантов; в случае колонии культуры Hfr, претерпевшей обратную мутацию и вернувшейся к состоянию F^+ , будут видны только 0, 1 или 2 рекомбинантные колонии.

5. Если в культуре достаточно много ревертантов типа F^+ , из исходной чашки с агаром Penassay можно отобрать колонию, имеющую фенотип Hfr.

Метод отбора и посева штрихом

1. Делают посев Hfr-культуры для получения отдельных колоний в чашке с агаром Penassay.

2. Отбирают 10—20 колоний в отдельные пробирки диаметром 13 и высотой 100 мм, содержащие по 2 мл бульона.

3. Инкубируют культуры при 37 °C в течение 4—6 ч, пока их плотность не достигнет $2 \cdot 10^8$ — $5 \cdot 10^8$ клетка/мл. В качестве контроля выращивают культуры штаммов типа F^- и F^+ , например штаммы 5 и 7 (табл. 14.1).

4. Наносят штрихом 50—100 мкл выращенной в бульоне находящейся в логарифмической фазе культуры F^- штамма 13 ниже центра чашки с агаром, приготовленным на минимальной среде, селективной по отношению к трансконъюгантам типа Leu^+Str^r . Крышку чашки оставляют приоткрытой до тех пор, пока штрих не подсохнет. (При желании на одной чашке можно разместить два штриха.)

5. Сразу же наносят штрихи петлями, полными клеток Hfr, F^- и F^+ так, чтобы эти штрихи пересекали штрих F^- (соблюдая осторожность, чтобы не коснуться

петлей стенок пробирки, что приведет к потере материала и разбросу результатов). Штрихам дают подсохнуть и инкубируют чашку при 37°C в течение 24—48 ч.

6. Штрих культуры, состоящей преимущественно из клеток с фенотипом Hfr, даст в месте пересечения двух штрихов сплошной рост трансконъюгантов, в то время как штрих культуры, состоящей в основном из F⁺-клеток, даст в месте пересечения лишь 5—10 обособленных колоний трансконъюгантов. При пересечении штрихов культур F⁻ и F⁻, понятно, трансконъюганты вообще не выявляются.

Оба приведенных метода основаны на том, что клетки донора способны передавать свои хромосомы в присутствии стрептомицина (с несколько сниженной частотой), хотя в конечном итоге они погибают от стрептомицина на минимальном селективном агаре. Налидиксовую кислоту нельзя использовать в этой системе для негативного отбора против клеток донора, так как она вызывает немедленное прекращение переноса генетического материала донорами типа Nal^s.

Осуществление прерываемой конъюгации

Если необходимо, используют очищенный повторным выделением штамм Hfr и штамм F⁻. Проводят операции, описанные в этапах 1—5 в «Метод переноса плазмид F'» (разд. 14.3.1), с той разницей, что применяют минимальный агар, селективный по отношению к трансконъюгантам типов Leu⁺Nal^r, Pro⁺Nal^r, Ade⁺Nal^r, и методы разведения и посева, которые заключаются в следующем.

1. Через соответствующие интервалы времени (каждые 2, 3, 5 или 10 мин; для более частого отбора проб требуются два человека) 100 мкл смеси конъюгирующих клеток и 0,9 мл СБЖ, содержащего 50 мкг/мл налидиксовой кислоты, вносят в пробирки размером 13×100 мм при 37°C.

2. Инкубируют эти разведения (10⁻¹) при 37°C в течение 30—40 мин, учитывая в момент отбора смеси, что за счет последующих разведений и посева время инкубации увеличивается примерно на 30 с.

Таблица 14.2. Конечные разведения для посева, используемые для выявления трансконъюгантов различных классов при конъюгации^а типа Hfr×F⁻

Время прерывания конъюгации, мин	Класс отбираемых трансконъюгантов								
	Leu ⁺	Nal ^r	Pro ⁺	Nal ^r	Ade ⁺	Nal ^r	Trp ⁺	Nal ^r	
5	10 ⁻²		10 ⁻²		— ^б			— ^б	
10	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²		10 ⁻²			—	
15	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²			—	
20	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³		—	
25	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²		
30	10 ⁻⁴	10 ^{-5^б}	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²		
35	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	
40	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ^{-5^б}	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻³	
45	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ^{-4^б}		10 ⁻³	10 ⁻⁴	
50	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴		10 ⁻³	10 ⁻⁴	
55	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴		10 ⁻³	10 ⁻⁴	
60	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴		10 ⁻³	10 ⁻⁴	

^а По результатам, ожидаемым в том случае, если рост и конъюгация штаммов 12 и 14 (табл. 14.1) осуществляются в оптимальных условиях.

^б Посев не обязателен, так как для этого времени прерывания появление трансконъюгантов не ожидается.

^в Титр трансконъюгантов должен приближаться к максимальной ожидаемой частоте. Для некоторых или всех последующих времен прерывания конъюгации посевы можно не делать.

3. Для каждого времени прерывания конъюгации высевают либо по 50 мкл смеси в две чашки с селективным агаром, либо 100 мкл в одну чашку. В табл. 14.2 приведены приблизительные величины окончательных разведений, высеваемых на каждый селективный агар, для разных значений времени прерывания спаривания. Эти величины соответствуют случаю, когда отношение числа клеток донора и реципиента равно 1:10, суммарная плотность смеси составляет $2 \cdot 10^8$ клетка/мл, используется чистая Hfr-культура, а условия для проявления фенотипа Hfr и для переноса Hfr-хромосом являются оптимальными.

4. Для определения титров чашки с агаром Penassay инкубируют в течение ночи при 37°C. Если штамм Hfr перед использованием не подвергался очистке повторным выделением, фракцию клеток Hfr можно определить на чашках с агаром Penassay одним из методов, описанных выше в «Определении стабильности фенотипа Hfr».

5. Инкубируют чашки с минимальным селективным агаром двое суток при 37°C. Колонии при подсчете не разрушают, а чашки оставляют, поскольку их можно использовать для определения наследования маркеров, по которым не велся отбор.

6. Рассчитывают частоты появления трансконъюгантов путем деления титра трансконъюгантов каждого типа и для каждого значения времени прерывания на титр клеток Hfr в смеси в начале конъюгации. Полученные данные можно использовать для построения графика, по которому определяют время поступления с хромосомой каждого из отбираемых Hfr-маркеров.

*Анализ трансконъюгантов
на наследование признаков,
по которым отбор не производился*

Иногда невозможно произвести отбор на наследование некоторых маркеров донора, или это трудно осуществить из-за большого числа маркеров, наследуемых в каждом конкретном случае. В связи с этим для оценки порядка расположения генетических локусов часто проводят более традиционный рекомбинационный анализ. Обычно это делают так: иглой или зубочисткой отбирают 100—200 колоний данного типа трансконъюгантов, клетки суспендируют в СБЖ и высевают штрихом на ту же селективную среду, чтобы получить очищенные обособленные колонии. Эти колонии можно затем нарастить в виде культур и использовать их для проверки генотипов путем посева штрихом на соответствующие среды или в виде пятна на подходящую агаровую среду с последующим анализом методом отпечатков. В последнем случае в исходной чашке должна находиться среда, селективная по отношению к фенотипу трансконъюганта, а среда в каждой чашке-копии должна помимо этой селективности обладать селективными свойствами в отно-

шении тех или иных способностей или потребностей штамма в питательных веществах. Заранее ясно, что при таком подходе иногда не будет четких результатов, потому что порой не удастся полностью очистить отбираемый тип трансконъюганта от родительских форм, существовавших до нанесения в исходную чашку.

Поскольку перенос хромосом доноров Hfr-типа прерывается спонтанно, для четкого определения последовательности генов рекомбинантным анализом нужно, чтобы рекомбинанты, несущие заведомо известные маркеры, были протестированы на наследование близлежащих перенесенных маркеров. Так, в случае скрещивания штаммов 12 и 14 (табл. 14.1) отбирают 200—400 трансконъюгантов типа Trp^+Nal^r , очищают их и тестируют на наличие маркеров Hfr: ara^+ , leu^+ , tonA^+ , proA^+ , lac^+ , tsx^+ , purE^+ и galK^+ . Это делают следующим образом:

1. Культуры очищенных трансконъюгантов типа Trp^+Nal^r высевают в виде точек (50—100) в чашку на минимальный агар, селективный по отношению к этому типу. Инкубируют в течение ночи при 37 °C и последовательно перепечатывают в чашки с минимальным агаром, селективным по отношению к трансконъюгантам типов $\text{Ara}^+\text{Trp}^+\text{Nal}^r$, $\text{Leu}^+\text{Trp}^+\text{Nal}^r$, $\text{Pro}^+\text{Trp}^+\text{Nal}^r$, $\text{Lac}^+\text{Trp}^+\text{Nal}^r$, $\text{Ade}^+\text{Trp}^+\text{Nal}^r$, $\text{Gal}^+\text{Trp}^+\text{Nal}^r$. Последняя чашка представляет собой контроль, позволяющий убедиться в том, что клетки были действительно перенесены при перепечатывании в каждую из чашек.

2. Проверку устойчивости или чувствительности к фагам T5 (*tonA*) и T6 (*tsx*) точнее всего проводить посевом штрихов бульонных культур очищенных трансконъюгантов и пересекающихся с ними штрихов соответствующего фага в чашки со средой ЕМВ0 (см. 2-й этап в «Характеристике свойств трансдуктантов», разд. 14.2.1). Следует, однако, иметь в виду, что такая операция очень трудоемкая; иногда достаточно точные результаты дает метод отпечатков. В последнем случае в чашки с агаром ЕМВ0 вносят 50—100 мкл фаголизатов T5 и T6 (с концентрацией $\sim 10^{10}$ ПОЕ/мл). Для каждого фага при перепечатывании с исходной чашки берут свой кусок бархата, так как перенос фага из одной чашки в другую может исказить результаты. Несмотря на то что мутация *tonA* обуславливает также

устойчивость к фагу T1, при обращении с этим фагом следует соблюдать особую осторожность и твердо придерживаться правил асептики. Фаг T1 устойчив к высушиванию и обладает очень коротким латентным периодом. Именно из-за него не одна лаборатория вынуждена была свернуть исследования с применением *E. coli*.

После того как установлен фенотип всех трансконъюгантов типа Tgr^+Nal^r , можно подсчитать число рекомбинантов каждого класса и, исходя из него, получить расстояния между маркерами на генетической карте и их последовательность в *Hfr*-хромосоме.

Применение

Используя разнообразные родительские формы *Hfr* в отношении начала и направления хромосомного переноса при изучении конъюгации с помощью метода пересекающихся штрихов на агаре, для мутантного аллеля, выявляемого в реципиенте F^- , легко установить ориентировочное расположение аллеля дикого типа [4]. В целях более точной его локализации по отношению к другим генам можно использовать прерываемую конъюгацию с соответствующим штаммом *Hfr*. Однако, чтобы точно указать расположение этого локуса по отношению к локусам, находящимся в непосредственной близости от него, может оказаться необходимой общая трансдукция, опосредованная фагом P1, так как конъюгация часто не вполне подходит для этой цели.

14.4. СРЕДЫ И ШТАММЫ

Как правило, в работе по переносу генов используют самые обычные, имеющиеся в продаже среды. Ниже описаны только те из них, которые требуют модификации или дополнительных добавок. Приводятся также источники штаммов бактерий и фагов.

14.4.1. L-Бульон и L-агар [24]

Для приготовления L-бульона на 1 л воды берут 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl и 1 г глюкозы. pH раствора доводят до 7,0 добавлением перед

автоклавированием приблизительно 1,7 мл 1 н. NaOH. L-агар — это L-бульон, содержащий 1,5% агара. Для получения сплошного лизиса в чашках с использованием бактериофага P1 берут 1,2% агара. Мягкий L-агар содержит 0,65% сухого агара. Для экспериментов с такими фагами, как P1, к L-средам добавляют CaCl_2 до конечной концентрации 2,5 мМ, причем это делают после автоклавирования и охлаждения среды по крайней мере до 70°C. Среда с CaCl_2 не подлежат повторному автоклавированию, поскольку при автоклавировании в них может образоваться осадок. Обычно для работы готовят стерильный водный раствор 1 М CaCl_2 .

14.4.2. Агар лямбда

Для прикрепления и проникновения в бактериальную клетку бактериофага λ на поверхности клетки должны присутствовать белки переноса мальтозы, синтез которых тормозится глюкозой по механизму катаболитной репрессии. Поэтому агар лямбда не должен содержать глюкозу. При его приготовлении на 1 л воды добавляют 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl и 12 г агара. pH доводят до 7,0 перед автоклавированием добавлением 1,7 мл 1 н. NaOH. Мягкий агар лямбда содержит 0,65% агара и 10 мМ Mg^{2+} .

14.4.3. Супер-бульон [26]

Приготовление λ -фаголизатов и лизатов многих других фагов лучше всего удается, когда для выращивания клеток-хозяев используют богатую питательную среду. Одна из таких сред — супер-бульон — содержит в 1 л 32 г триптона, 20 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl. pH доводят до 7,0 перед автоклавированием добавлением приблизительно 5 мл 1 н. NaOH. Для лучшего размножения фага к бульону после автоклавирования добавляют MgSO_4 до 10 мМ. Обычно для работы готовят водный раствор 1 М MgSO_4 .

14.4.4. Агар Penassay

Имеющийся в продаже агар Penassay вполне удовлетворителен в качестве общей комплексной агаровой среды, но добавление NaCl (8 г/л) значительно расширяет

область его использования во многих экспериментах по бактериальной генетике. Имеющийся в продаже бульон Penassay уже содержит моновалентные катионы.

14.4.5. ЕМВ-агар и агар Мак-Конки

Изготавливаемые в промышленных масштабах агары ЕМВ и Мак-Конки являются удовлетворительными индикаторными в отношении брожения средами при работе с грамотрицательными кишечными бактериями. Однако, поскольку многие штаммы *E. coli*, *Salmonella*, а также другие штаммы, используемые в экспериментах по переносу генов, имеют мутации, которые делают их ауксотрофами по отношению к пуринам, пиримидинам и (или) витаминам, следует на каждый литр среды добавлять 5 г дрожжевого экстракта. Желательно также добавление NaCl в количестве 5 г/л в среды, используемые для проверки чувствительности штаммов бактерий к фагу. Агары ЕМВ и Мак-Конки обычно дополняются сахарами до конечной концентрации 1% и обозначаются ЕМВ+Gal, Mac+Lac и т. д. ЕМВ-агар, не содержащий сахаров, используется для проверки чувствительности бактерий к фагам и обозначается как ЕМВ0-агар. В табл. 14.3 перечислены концентрации стерильных исходных растворов наиболее часто используемых сахаров.

14.4.6. Минимальная среда VB-E [37]

Для приготовления 50-кратного исходного раствора в 670 мл дистиллированной или деионизованной воды последовательно растворяют 10 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 г лимонной кислоты, содержащей один остаток воды, 500 г безводного K_2HPO_4 и 175 г $NaNH_4PO_4 \cdot 4H_2O$. Окончательный объем раствора 1 л. Чтобы приготовить однократную жидкую минимальную среду VB-E, приливают 20 мл стерильного 50-кратного раствора к приблизительно 960 мл стерильной дистиллированной или деионизованной воды с таким расчетом, чтобы при внесении стерильного раствора углеводов и других требуемых добавок (см. ниже) конечный объем равнялся бы 1 л. Для приготовления однократной минимальной ага-

ровой среды VB-E к 960 мл дистиллированной или деионизованной воды добавляют 15 г агара и автоклавируют; после остывания до 60—70°C добавляют 20 мл стерильного 50-кратного раствора и соответствующее количество углеводных и других добавок. При использовании в качестве индикатора брожения триметилтетразолий-хлорида его добавляют к агару перед автоклавированием. Однократные минимальные жидкая (ML) и агаровая (MA) среды имеют pH 7.

14.4.7. Солевой буфер с желатиной (СБЖ; [10])

СБЖ относится к растворам, используемым для разведения. Присутствующая в нем желатина стабилизирует фаговые частицы и хрупкие бактериальные клетки, а также улучшает точность разведений. Для приготовления СБЖ смешивают 8,5 г NaCl, 0,3 г безводного KH_2PO_4 , 0,6 г безводного Na_2HPO_4 , 10 мл 1%-ной желатины и 990 мл воды.

14.4.8. Добавки

Углеводные источники энергии для бактерий (табл. 14.3) обычно добавляют к минимальным средам до конечной концентрации 0,5%.

Таблица 14.3. Концентрации стерильных исходных растворов источников углерода^а

Источники углерода	Концентрация основного раствора, %	Источники углерода	Концентрация основного раствора, %
L-Арабиноза	20	Мальтоза	30
D-Галактоза	30	D-Маннитол	10
D-Глюкоза	40	Янтарнокислый натрий	20
D-Глицерин ^б	40		
Лактоза	20	D-Ксилоза	30

^а Все концентрации приведены в единицах веса на объем. Подогрев дистиллированной (или деионизованной) воды способствует растворению углеводов, но перед доведением до точного объема этим растворам дают остыть до комнатной температуры. Перед использованием все растворы стерилизуют автоклавированием (для объемов, не превышающих 250 мл в течение 20 мин) и затем хранят при 4°C.

^б Поскольку глицерин — жидкость, для получения его 40%-ного (вес/объем) раствора добавляют 31,7 мл исходного раствора к 68,3 мл воды.

Казаминовые кислоты или другие кислотные гидролизаты казеина, как правило, добавляют к минимальным средам до конечной концентрации 0,5%. 10%-ные (вес/объем) исходные стерильные растворы хранят при 4°C. Добавка аминокислот к минимальным средам стимулирует рост бактерий и особенно полезна при проведении генетических экспериментов с мутантами, требующими присутствия триптофана (который разрушается при кислотном гидролизе белков), пуринов, пиримидинов и витаминов. В последнем случае используют смесь аминокислот без примеси витаминов.

Оптимальные концентрации добавляемых в минимальные среды аминокислот, пуринов, пиримидинов и витаминов, при которых становится возможным рост клеток с ауксотрофными мутациями, часто приходится определять эмпирически. Среди факторов, имеющих важное значение при подборе концентраций добавляемых веществ, укажем следующие: количество добавляемого соединения в биомассе клеток, эффективность проникновения этого соединения в клетку, использование его для синтеза клеточных компонентов, способность бактерий расщеплять добавляемое вещество. В табл. 14.4 приведены концентрации аминокислот, пуринов, пиримидинов и витаминов в стерильных исходных концентрированных растворах и конечные концентрации этих веществ при добавлении к минимальным средам, позволяющие обеспечить максимальный рост мутантных штаммов *E. coli* и других грамотрицательных бактерий.

В экспериментах, связанных с переносом генов, часто используются штаммы бактерий, обладающие устойчивостью к антибиотикам либо за счет хромосомных мутаций, либо за счет присутствия R-плазмид (гл. 15). В табл. 14.5 включены концентрации антибиотиков в исходных концентрированных растворах и концентрации антибиотиков, обычно используемые в опытах по переносу генов, в средах для грамотрицательных кишечных бактерий. Следует отметить, что в стерилизации исходных концентрированных растворов антибиотиков нет необходимости, если были соблюдены соответствующие меры предосторожности во время их приготовления. При этом используют бумагу для взвешивания из закрытой коробки или запечатанного контейнера (бумага, нахо-

Таблица 14.4. Концентрации аминокислот, пуринов, пиримидинов и витаминов для основных растворов и для добавок к минимальным средам^a

Соединения	Концентрация основного раствора, мг/мл	Количество основного раствора, добавляемого на 1 л минимальной среды, мл	Конечная концентрация в минимальных средах, мкг/мл ^б
<i>Аминокислоты^а</i>			
DL-Аланин ^с	50,0	2,0	100
L-Аргинин·HCl	11,0	2,0	22
L-Аспарагин	10,0	10,0	100
L-Аспарагиновая кислота	10,0	10,0	100
L-Цистеин HCl ^д	11,0	2,0	22
Глицин	50,0	2,0	100
L-Глутаминовая кислота	10,0	10,0	100
L-Глутамин	20,0	5,0	100
L-Гистидин·HCl	11,0	2,0	22
L-Изолейцин	10,0	2,0	20
L-Лейцин	10,0	2,0	20
L-Лизин·HCl	44,0	2,0	88
DL-Метионин	10,0	2,0	20
L-Фенилаланин	10,0 ^е	2,0	20
L-Пролин	15,0	2,0	30
DL-Серин	10,0	10,0	100
DL-Треонин	40,0	2,0	80
L-Триптофан	4,0	5,0	20
L-Тирозин	2,0 ^ж	10,0	20
DL-Валин	20,0	2,0	40
<i>Пурины и пиримидины</i>			
Аденин	2,0 ^з	20,0	40
Тимидин	10,0	0,4 или 4,0	4 или 40 ^и
Тимин	5,0	0,4 или 8,0	2 или 40 ^и
Урацил	2,0	20,0	40

Соединения	Концентрация основного раствора, мг/мл	Количество основного раствора, добавляемого на 1 л минимальной среды, мл	Конечная концентрация в минимальных средах, мкг/мл
Витамины			
Биотин	0,25	2,0	0,5
Никотиновая кислота	0,5	2,0	1
Пантотенат кальция	0,5	2,0	1
Пиридоксин·HCl	0,5	2,0	1
Тиамин·HCl	0,5	2,0	1

^a Все основные концентрированные растворы готовят на дистиллированной или деионизованной воде и хранят при 4°C, если нет других указаний. Стерилизовать можно либо автоклавированием (15 мин для объемов, не превышающих 100 мл), либо фильтрованием.

^b Приведенные концентрации обеспечивают оптимальный рост ауксотрофов *E. coli*. Для мутантных штаммов других видов бактерий могут понадобиться несколько другие концентрации.

^c L-Изомеры рекомендуются в том случае, если их цена не более чем вдвое превышает цену DL-рацемата.

^d Бактерии, обладающие аланинрацемазой, способны утилизировать как D-, так и L-изомеры.

^e Раствор L-цистеина·HCl должен быть свежеприготовленным (не более недельной давности), так как цистеин быстро окисляется до цистина, который очень плохо растворяется. Другой способ предохранения основного раствора L-цистеина·HCl от окисления — после автоклавирования наклонить на него стерильное вазелиновое масло.

^f Готовят в 0,001 н. NaOH и хранят при комнатной температуре.

^{жс} Готовят в 0,01 н. NaOH и хранят при комнатной температуре.

^з Готовят в 0,03 н. HCl.

^и *thyA*-Мутантам энтеробактерий требуются относительно большие концентрации тимицина или тимидина. Штаммы *thyA* с мутациями *deoB* или *deoC* (при которых блокируются функции дезоксирибомутазы и дезоксирибоальдоза-зы соответственно) не способны утилизировать дезоксирибозо-1-фосфат и поэтому растут при пониженных концентрациях либо тимина, либо тимидина.

длежащая в упаковке, как правило, стерильна), стерильные емкости (бутыли или пробирки) и стерильную воду или спирт для приготовления суспензий. Заметим, что ампициллин, рифампин и тетрациклин относительно нестойки; в связи с этим среды, содержащие эти антибиотики, должны быть израсходованы в течение нескольких дней. Срок хранения сред с тетрациклином и рифампи-

Таблица 14.5. Концентрации антибиотиков для основных растворов и добавок к средам

Антибиотик	Концентрация основного раствора, мг/мл	Конечная концентрация в среде (мкг/мл) для выявления	
		устойчивости, обусловленной R-плазмидами	устойчивости, обусловленной хромосомной мутацией
Ампициллин	— ^а	25—50	10—20
Хлорамфеникол	25 ^б	25—50	—
Налидиксовая кислота	10 ^в	—	50 ²
Рифампин	2 ^д	—	50
Стрептомицин	50 ^е	25—50	100—400
Тетрациклин	— ^ж	25—50	—

^а Растворы ампициллина нестабильны, поэтому взвешенный порошок антибиотика суспендируют в стерильной воде и сразу добавляют к средам до желаемых конечных концентраций. Можно также приготовить исходный концентрированный раствор и хранить его при -20°C . Чтобы получить точную концентрацию чистого ампициллина, следует ввести поправки на буферы и другие ингредиенты.

^б Суспендируют в 50%-ном этаноле и хранят при 4°C .

^в Суспендируют в 0,1 н. NaOH, превращающем кислоту в натриевую соль, и хранят при 4°C .

² Добавляют к ЕМВ-агару в концентрации 75 мкг/мл.

^д Растворяют в 100% ном метаноле в концентрации 20 мг/мл, после чего раствор разводят стерильной водой до получения 2 мг/мл в 10% ном метаноле. Хранят при 4°C в темноте и каждую неделю готовят заново.

^е Суспендируют в стерильной воде и хранят при 4°C .

^ж Растворы тетрациклина нестабильны, поэтому взвешенный порошок антибиотика суспендируют в стерильной воде и сразу добавляют к средам до желаемых конечных концентраций. Можно также приготовить исходный концентрированный раствор и хранить его в темноте при -20°C . В связи с тем что в препаратах тетрациклина часто присутствует аскорбиновая кислота в довольно большой концентрации, следует делать необходимые поправки.

ном продлевается, если они содержатся в темноте. Продукты же распада тетрациклина токсичны как для Tc^s , так и для Tc^r -бактерий.

14.4.9. Приготовление агаровых сред

Агар для приготовления и определения титра фаголизатов нужно разливать в чашки, находящиеся на выставленной по уровню горизонтальной поверхности. Выход фага и размер стерильных пятен увеличиваются,

если в чашку заливают 35—40 мл агаровой среды. Важно также, чтобы агар в чашках, предназначенных для спот-теста, не был ни слишком подсохшим, ни слишком увлажненным. Качество агара улучшается, если его разливают в чашки за два дня до использования; затем оба дня или один день перед работой его выдерживают при комнатной температуре и инкубируют с закрытой крышкой 12 ч при 37 °С. Если лизат готовят из сплошного гона в чашке, агар заливают в чашки за день до опыта и не подсушивают при 37 °С.

Минимальный агар в чашках, которые часто необходимо инкубировать по двое суток, должен иметь объем ~25—30 мл. Процессы брожения на ЕМВ-агаре или агаре Мак-Конки также идут лучше, если в чашках содержится по крайней мере по 25 мл агаровой среды.

14.4.10. Хранение агаровых сред

Большинство агаровых сред, за исключением тех, которые содержат нестабильные антибиотики (табл. 14.5), можно помещать в пластмассовые мешки и хранить при 4 °С в течение нескольких месяцев. Среды с красителями и другими окрашенными соединениями следует хранить в темноте. Это особенно важно для ЕМВ-агара, который, подвергшись фотоокислению, тормозит рост бактерий.

14.4.11. Поставщики штаммов бактерий и фагов

Штаммы. *E. coli*. Coli Genetic Stock Center, Dr. Barbara Bachman, Department of Human Genetics, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, CN 06510.

Штаммы других бактерий и фагов. American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852.

14.5. ЛИТЕРАТУРА

14.5.1. Общая литература

1. *Clowes R. C., Hayes W* Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968.
Книга немного устарела, но содержит много полезных методов и прописей для экспериментов в области молекулярной генетики.

2. *Miller J. H.* Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1972.
Современное и полное собрание методов и прописей для экспериментов в области молекулярной генетики и молекулярной биологии.

14.5.2. Специальная литература

3. *Achtman M.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., **60**, 79—123 (1973).
4. *Adams M. H.* Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, 1959.
5. *Bachmann B. J., Low K. B., Taylor A. L.* Bacteriol. Rev., **40**, 116—167 (1976).
6. *Berg C. M., Curtiss R., III.* Genetics, **56**, 503—525 (1967).
7. *Bukhari A. I., Shapiro J. A., Adhya S. L. (ed.)*. DNA insertion elements, plasmids, and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1977.
8. *Caro L., Berg C. M.* Methods Enzymol., **21D**, 444—458 (1971).
9. *Cosloy S. D., Oishi M.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **70**, 84—87 (1973).
10. *Curtiss R., III.* J. Bacteriol., **89**, 28—40 (1965).
11. *Curtiss R., III.* Annu. Rev. Microbiol., **23**, 69—136 (1969).
12. *Curtiss R., III, Fenwick R. G., Jr., Goldschmidt R., Falkingham J. O., III.* In: S. Mitsuhashi (ed.). R factor drug resistance plasmid, p. 109—134. University of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
13. *Curtiss R., III, Macrina F. L., Falkingham J. O., III.* In: R. C. King (ed.), Handbook of genetics, vol. 1, p. 115—133. Plenum Publishing Corp., New York, 1975.
14. *Demerec M., Adelberg E. A., Clark A. J., Hartman P. E.* Genetics, **54**, 61—76 (1966).
15. *Enea V., Vovis G. F., Zinder N. D.* J. Mol. Biol., **96**, 495—509 (1975).
16. *Falkow S.* Infections multiple drug resistance. Pion Limited, London, 1975.
17. *Goldberg R. B., Bender R. A., Streicher S. L.* J. Bacteriol., **118**, 810—814 (1974).
18. *Hayes W.* The genetics of bacteria and their viruses, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1968.
19. *Hershey A. D.* The bacteriophage lambda. Cold Spring Harbor, New York, 1971.
20. *Hong J.-S., Ames B. N.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **68**, 3158—3162 (1971).
21. *Jacob F., Wollman E. L.* Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press, Inc., New York, 1961.
22. *Juni E. J.* Bacteriol., **112**, 917—931 (1972).
23. *Juni E., Janik A. J.* Bacteriol., **98**, 281—288 (1969).
24. *Lennox E. S.* Virology, **1**, 190—206 (1955).
25. *Lewin B.* Gene expression — 3. Plasmids and phages. John Wiley and Sons, Inc., New York (1977).
26. *Lodish H. F.* J. Mol. Biol., **50**, 689—702 (1970).
27. *Low K. B.* Bacteriol. Rev., **36**, 587—607 (1972).

28. *Mandel M., Higa A.* J. Mol. Biol., **53**, 159—162 (1970).
29. *Marmur J.* J. Mol. Biol., **3**, 208—218 (1961).
30. *Nishimura Y., Caro L., Berg C. M., Hirota Y.* J. Mol. Biol., **55**, 441—456 (1971).
31. *Notani N. K., Setlow J. K.* Prog. Nucleic Acid Res., **14**, 39—100 (1974).
32. *Novick R. P., Clowes R. C., Cohen S. N., Curtiss R., III, Datta N., Falkow S.* Bacteriol. Rev., **40**, 168—189 (1976).
33. *Ozeki H.* Carnegie Inst. Washington Publ. 612, p. 97—106 (1956).
34. *Sawula R. V., Crawford I. P.* J. Bacteriol., **112**, 797—805 (1972).
35. *Shimada K., Weisberg R. A., Gottesman M. E.* J. Mol. Biol., **63**, 483—503 (1972).
36. *Tomasz A.* Annu. Rev. Genet., **3**, 217—232 (1969).
37. *Vogel H. J., Bonner D. M.* J. Biol. Chem., **218**, 97—106 (1956).
38. *Willetts N. S.* In: S. Mitsuhashi (ed.), R factor drug resistance plasmid, p. 89—107. University of Tokyo Press, Tokyo (1977).
39. *Zinder N. D., Lederberg J. J.* Bacteriol., **64**, 679—699 (1952).

ПЛАЗМИДЫ

Дж. Кроса, С. Фалкоу

Термин «плазмиды» впервые был применен Ледербергом [21] для обозначения всех внехромосомных наследственных детерминант. В настоящее время под этим термином понимают независимо реплицирующуюся внехромосомную ДНК бактерий. Хотя плазмиды не обязательны для жизнедеятельности бактерий в целом, они могут кодировать разнообразные генетические детерминанты, позволяющие бактериям-хозяевам лучше выживать в неблагоприятных условиях или успешнее конкурировать с другими микроорганизмами, занимающими ту же экологическую нишу. Плазмиды имеются у множества бактерий и рассматривать в общем плазмиды так же трудно, как рассматривать в общем несущие их бактерии. В медицинском отношении важны, как известно, плазмиды, определяющие устойчивость к антибиотикам, — R-плазмиды, а также те из них, которые прямо оказывают влияние на патогенность микробов. Однако с позиций изучения структуры и функции ДНК все плазмиды представляют одинаковую ценность. В последнее время плазмиды приобрели первостепенное значение в технике создания рекомбинантных молекул ДНК.

Методы, которыми при помощи плазмид изучают перенос генов, были описаны в гл. 14. Данная же глава посвящена выделению и характеристике плазмид, в основном плазмид грамотрицательных бактерий, так как они изучены лучше других. Тем не менее описываемые методы могут быть с успехом применены к плазмидам любой бактерии, если имеются подходящие способы их выделения из клеток в мягких условиях.

Многие методы, применяемые в настоящее время для выделения плазмидной ДНК, основываются на ее суперспиральной ковалентно замкнутой кольцевой структуре. Согласно всем этим методикам, необходим лизис

клеток в мягких условиях, так чтобы плазмидная ДНК сохранялась при этом в интактном состоянии и могла быть отделена физическими методами от более массивной хромосомной ДНК. Хотя обычно плазмидная ДНК имеет мол. массу в пределах $0,5-100 \cdot 10^6$, у некоторых больших плазмид она может составлять $100-300 \cdot 10^6$ [2, 12, 22, 24, 26, 27, 30]. Для сравнения напомним, что хромосомная ДНК *E. coli* имеет мол. массу $2200-3000 \cdot 10^6$.

Выявление свойств бактериальной плазмиды обычно начинают на генетическом уровне. Если есть подозрение на то, что какой-то бактериальный признак обусловлен плазмидой, в экспериментах по переносу генов часто можно показать передачу плазмидных детерминант независимо от хромосомных. Если же этот признак исчезает при обработке бактериальной популяции излечивающими агентами, такими, как акридиновый оранжевый или бромистый этидий, то можно быть почти уверенным в его плазмидном происхождении. В большинстве случаев, однако, необходимо непосредственно убедиться в существовании плазмиды и в том, что именно она определяет изучаемый генетический признак.

Если есть возможность, лучше всего перенести генетическими способами плазмиду какой-либо бактерии-хозяину, о которой известно, что она не имеет собственных плазмид. Для многих грамотрицательных бактерий этой цели лучше всего отвечает один из хорошо изученных F⁻-штаммов *E. coli* K-12, такой, например, как C600. Хорошо охарактеризованные бесплазмидные штаммы известны и для других видов (например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* и др.). Бесспорное преимущество такого подхода заключается в том, что после переноса отдельной плазмиды в подобный штамм при ее последующем выделении нет боязни загрязнения плазмидами клетки-хозяина.

В тех случаях, когда генетические методы недоступны, приходится прямо проверять бактерию на содержание плазмид. Обычно таким анализом можно определить лишь, имеется плазмиды или нет. Затем можно провести соответствующую проверку штамма, потерявшего генетический признак (спонтанно или в результа-

те обработки химическими агентами), чтобы определить, теряется ли плазмида синхронно с определенной функцией клетки-хозяина.

В клинической лаборатории или в лаборатории, где изучают рекомбинантные ДНК, часто бывает важно проанализировать большое число выделяемых штаммов на содержание плазмид. В клиническом аспекте набор плазмид в клетке может служить полезным эпидемиологическим маркером, а в научно-исследовательской лаборатории часто требуется идентифицировать различные классы рекомбинантной ДНК.

15.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

15.1.1. Выделение с помощью тритона X-100 (для *E. coli* K-12)

Приводимый ниже метод [4, 19] хорошо подходит для выделения плазмидной ДНК штаммов *E. coli* K-12 в том случае, если клетки лизируют неионным детергентом тритоном X-100 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, 92634).

1. Клетки выращивают при 37 °C либо в богатой питательной среде (например, в сердечно-мозговом бульоне), либо в подходящей минимальной среде в условиях слабой аэрации, достигаемой покачиванием колбы на скорости, которой едва хватает, чтобы привести в движение поверхность среды. Культуру объемом 100 мл помещают в 250-мл колбу Эрленмейера; эти величины могут быть пропорционально уменьшены или увеличены. Для получения оптимального лизиса клетки следует собирать в середине логарифмической фазы роста.

2. Суспензию с клетками центрифугируют в 250-мл стаканах (например, в течение 10 мин при 12 100 g при 5 °C) в роторе GS-A центрифуги Sorvall, ресуспендируют осадок в 15 мл буфера ТЭН (0,05 трис, 0,005 M ЭДТА, 0,05 M NaCl, pH 8,0), переносят в 40-мл стакан и центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 10 мин при 5 °C в роторе SS-34 центрифуги Sorvall. Осадок ресуспендируют в 1 мл охлажденного во льду 25%-ного раствора сахарозы (в 0,05 M трисе, 0,001 M ЭДТА, pH 8,0) и оставляют стакан во льду на 30 мин.

3. Добавляют лизоцим (0,2 мл раствора с концентрацией 5 мг/мл в 0,25 М трисе, рН 8,0). Несколько раз круговыми движениями руки перемешивают содержимое центрифужного стакана и вновь оставляют его во льду на 10 мин.

4. Добавляют 0,4 мл 0,25 М ЭДТА, рН 8,0. Перемешивают содержимое и оставляют стакан во льду еще на 10 мин.

5. Добавляют 1,6 мл лизирующей смеси с тритоном X-100 (1 мл 10%-ного тритона X-100 в 0,01 М трисе, рН 8,0, плюс 25 мл 0,25 М ЭДТА, рН 8,0, плюс 5 мл 1 М триса, рН 8,0, плюс 69 мл воды). После *очень осторожного*, но тщательного перемешивания суспензии круговым движением стакан оставляют во льду на 20 мин.

6. Центрифугируют содержимое при 35 000 g в течение 20 мин при 5 °C на центрифуге Sorvall или Beckman J21 (в роторе SS-34 или JA-20 соответственно).

Этим методом от основной массы хромосомной ДНК и клеточных обломков отделяется около 95% плазмид. Обогащенную плазмидами надосадочную фракцию (3,2 мл) подвергают дальнейшей очистке и концентрированию центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия в присутствии бромистого этидия (цезий-этидиевый градиент; разд. 15.3.3).

15.1.2. Выделение с помощью тритона X-100 (для других грамотрицательных бактерий)

Квакенбуш (личное сообщение) несколько модифицировал изложенный в предыдущем разделе метод, благодаря чему была улучшена четкость полос в агарозном геле при электрофорезе (разд. 15.3.1). Его модификация относится к лизатам некоторых бактерий, например *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus retgeri* и *Klebsiella pneumoniae*.

1. Выращивают 40 мл культуры в 100-мл колбах со встряхиванием в сердечно-мозговом бульоне (Difco Laboratories, г. Детройт, шт. Мичиган).

2. Клетки собирают центрифугированием в течение 10 мин при 5000 об/мин (в роторе SS-34 на центрифуге Sorvall).

3. Клеточный осадок суспендируют в 5 мл буфера ТЭН (разд. 15.3.1).

4. Суспензию центрифугируют так же, как и ранее.

5. Осадок суспендируют в 2 мл 25%-ного раствора сахарозы (в 0,001 М ЭДТА, 0,05 М трисе, рН 8,0). Центрифужный стакан оставляют во льду на 20 мин.

6. Добавляют к суспензии 0,4 мл лизоцима (10 мг/мл в 0,25 М трисе, рН 8,0). Стакан оставляют во льду на 20 мин.

7. К клеточной суспензии добавляют 0,8 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0.

8. Клетки лизируют добавлением 4,4 мл тритоновой литической смеси (разд. 15.3.1) и аккуратно перемешивают.

9. Инкубируют смесь в центрифужном стакане при 65°C в течение 20 мин.

10. Обломки клеток удаляют центрифугированием при 27 200 g в течение 40 мин (в роторе SS-34 на центрифуге Sorvall).

11. К надосадочной жидкости добавляют раствор NaCl до конечной концентрации 0,5 М и полиэтиленгликоль (с мол. массой от 1000 до 6000) до конечной концентрации 10%, используя исходные растворы 5 М NaCl и 40%-ного полиэтиленгликоля.

12. Оставляют смесь в центрифужном стакане на ночь при 4°C.

13. Осаждают сформировавшийся осадок центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин (в роторе SS-34 на центрифуге Sorvall) и ресуспенсируют его в 1—2 мл 0,25 М NaCl, содержащего 0,001 М ЭДТА и 0,1 М трис-HCl, рН 8,0.

14. Осаждают ДНК добавлением двух объемов 95%-ного этанола при —20°C и оставляют на ночь при —20°C.

15.1.3. Выделение с помощью додецилсульфата натрия

Описываемый метод, разработанный Герри и др. [13], представляет собой модификацию метода Хирта [16]. Метод дает хорошие результаты для бактерий, которые лизируются детергентом додецилсульфатом нат-

рия (ДСН). Он основан на преимущественном осаждении этим детергентом в присутствии хлористого натрия высокомолекулярной хромосомной ДНК.

1. В 100-мл колбу с исследуемым бактериальным штаммом вносят 30 мл сердечно-мозгового бульона (Difco) и выращивают культуру в течение ночи на качалке в водяной бане при 37 °С.

2. Клетки осаждают центрифугированием при 12 100 g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок ресуспендируют в 1,5 мл 25%-ной сахарозы, 0,05 М триса и 0,001 М ЭДТА, pH 8,0.

3. К клеточной суспензии добавляют 0,2 мл раствора лизоцима (10 мг/мл лизоцима в 0,25 М трисе, pH 8,0) и осторожно перемешивают. Оставляют центрифужный стакан во льду на 15 мин.

4. Добавляют 0,1 мл 0,25 М ЭДТА, pH 8,0, осторожно перемешивают и вновь ставят стакан в лед на 10 мин.

5. Добавляют 0,1 мл 20%-ного раствора ДСН. Суспензию осторожно перемешивают и оставляют во льду на 10 мин. В течение этого времени клетки лизируются, и раствор становится вязким.

6. Осаждают хромосомную ДНК добавлением 3 М NaCl до конечной концентрации 1 М (обычно добавляют 0,9 мл 3 М NaCl). Оставляют стакан во льду по крайней мере на 2 ч, чтобы полностью сформировался осадок. Часто удобным оказывается оставлять стакан на ночь в холодильнике.

7. Осаждают хромосомную ДНК и все клеточные обломки центрифугированием в течение 30 мин при 17 000 об/мин и температуре 4 °С, отделяют надосадочную жидкость (обогащенную плазмидной ДНК), вносят ее в 15-мл пробирку из корекса.

8. Удаляют РНК добавлением одного объема дистиллированной воды и 4 мкл растворенной в 0,15 М NaCl рибонуклеазы с концентрацией 5 мг/мл (перед использованием раствор рибонуклеазы выдерживают 10 мин при 100 °С, чтобы инактивировать дезоксирибонуклеазы). Пробирку инкубируют дополнительно 1 ч при 37 °С.

9. Для депротенинизации смеси добавляют равный объем насыщенного трисом фенола. Смесь энергично встряхивают и затем центрифугируют в течение 20 мин

при 20 °С и скорости вращения ротора 5000 об/мин. Отбирают водную (верхнюю) фазу, содержащую ДНК, и повторяют всю процедуру еще раз.

10. Переносят водную фазу в 30-мл пробирку из корекса и добавляют к ней 3 М ацетат натрия (обычно ~0,6 мл) до конечной концентрации 0,3 М.

11. Добавляют 2 объема холодного (—20 °С) 95%-ного этанола. Хорошо перемешивают и оставляют на ночь при —20 °С.

12. Выпавшую в осадок ДНК осаждают центрифугированием при 12 100 g в течение 20 мин при —10 °С. Осторожно декантируют этанол и растворяют осадок ДНК в 0,2 мл 6 мМ триса, рН 7,5.

Полученную ДНК можно охарактеризовать электрофорезом в геле, центрифугированием в градиенте плотности или определением гомологичных последовательностей. Эти методы детально описаны в разд. 15.3.

15.1.4. Выделение с помощью лизостафина

Приводимая ниже методика успешно применяется для получения плазмид из грамположительных бактерий, а также из тех грамотрицательных бактерий, которые не лизируются тритоном X-100 и ДСН.

1. Клетки выращивают до середины логарифмической фазы роста в 30 мл сердечно-мозгового бульона в колбе на качалке. Культуру центрифугируют и осадок суспендируют в 1,5 мл 0,0075 М NaCl, 0,05 М ЭДТА, рН 7,0.

2. Добавляют лизостафин (Sigma Chemical Co., St. Louis MO 63178) до конечной концентрации 15 мкг/мл. (Для *Staphylococcus epidermidis* концентрацию этого фермента следует удвоить.) Инкубируют суспензию в течение 15 мин при 37 °С в условиях слабого покачивания, после чего оставляют колбу во льду.

3. Добавляют 1,5 объема смеси, содержащей 0,4%-ную дезоксихолевую кислоту, 1%-ный Brij-58 и 0,3 М ЭДТА, рН 8,0, чтобы лизировать клетки. Осторожно перемешивают вязкое содержимое пробирки и оставляют ее на 15 мин во льду.

4. Осколки клеток осаждают центрифугированием при 23 000 g в течение 20 мин и при температуре 4 °С

(в роторе Sorvall SS-34). Надосадочную жидкость декантируют в 15-мл корексовую пробирку.

5. Добавляют в пробирку 1 объем дистиллированной воды и 4 мкл раствора рибонуклеазы (1 мг/мл). Смесь инкубируют 1 ч при 37°C. Дальнейшую очистку ДНК проводят так же, как и в методе с применением ДСН (разд. 15.1.3).

15.1.5. Выделение с помощью пенициллина

Описываемая ниже методика может применяться для получения плазмидной ДНК грамположительных бактерий и таких грамотрицательных бактерий, которые устойчивы к тритону X-100 и ДСН, но чувствительны к пенициллину. Если изучаемая бактерия образует β -лактамазу, то эффективным может оказаться антибиотик, который устойчив к ферментам, расщепляющим пенициллин (например, цефалоспорин). Мы не уверены в том, что такой же положительный результат дадут другие антимикробные агенты, активные в отношении биосинтеза клеточной стенки; эту возможность было бы полезно исследовать.

1. Выращивают бактерии до середины логарифмической фазы роста, как описано в разд. 15.1.4. Добавляют пенициллин G из расчета 1 мг/мл и еще 2 ч инкубируют культуру при оптимальной для роста температуре. (Имеет смысл провести предварительные опыты, в которых следует определить время и концентрацию антибиотика, оптимальные для образования протопластов; целью при этом является максимальный выход протопластов при незначительном разрушении клеток. В данном случае может быть полезным добавление к ростовой среде 1 М сахарозы.)

2. Клетки, обработанные пенициллином, собирают центрифугированием, как и в предыдущих случаях, и дважды промывают их равными объемами 0,01 М трис-HCl, pH 8,2.

3. Клеточный осадок суспендируют в 0,25 объема 0,02 М триса, pH 8,2, 0,5 объема 1 М сахарозы и 0,25 объема раствора лизоцима (4 мг/мл) в 0,02 М трисе, pH 8,2.

4. Инкубируют клеточную суспензию в течение 1 ч при 37°C на качалке.

5. Центрифугируют ее при 27 000 g в течение 15 мин.

6. Осторожно суспендируют клетки в 0,02 М трисе, 0,01 М ЭДТА, рН 8,2, позаботившись о том, чтобы клетки в суспензии распределились равномерно.

7. Добавляют к суспензии 0,1 объема 10%-ного ДСН. Лизис должен завершаться в течение 10 мин. Дальнейшие операции проводят так же, как в методе с применением ДСН (разд. 15.1.3).

15.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С БОЛЬШОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ

Предложенные выше методы имеют ограничение: они годятся только для тех плазмидных ДНК, молекулярная масса которых не превышает $100 \cdot 10^6$. В то же время для ряда бактериальных систем известны большие плазмиды, такие, как вызывающие образование опухолей растений плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* [30], плазмиды, детерминирующие устойчивость к антибиотикам и относящиеся к группе несовместимости Н [12], плазмиды *Pseudomonas putida*, ответственные за разрушение камфоры [2, 24], а также разнообразные F-факторы [22, 26, 27]. В последнее время разработано несколько методов, позволяющих наряду с плазмидами небольшого размера выделять и эти большие плазмиды [9, 14, 17, 30]. Созданы также методы, дающие возможность работать с очень маленькими объемами или даже с материалом единственной колонии [10].

Метод, описываемый ниже, недавно разработали Портной и Уайт (личное сообщение). Его преимущество заключается в малых рабочих объемах; к тому же ему присущи лучшие стороны ранее опубликованных методик.

В этом методе используется та особенность плазмидной ДНК, что ее цепи не расходятся под воздействием щелочи. Когда клетки разрушают в щелочных условиях, выход плазмидной ДНК с большой молекулярной массой (до $350 \cdot 10^6$) улучшается. В настоящее время мы используем этот метод, ставший стандартным, для выявления плазмид в любой культуре бактерий.

Данный метод был успешно применен нами при выделении плазмид как из грамотрицательных бактерий (например, *Agrobacterium tumefaciens*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella* sp., *E. coli*), так и из грамположительных (например, *Staphylococcus* sp., и *Streptococcus* sp.). Как и при использовании других методов, мы заметили, что для морских вибрионов и для галофильных бактерий необходимы этапы промывки высококонцентрированными солевыми растворами (до 1 М NaCl).

Плазмидная ДНК, полученная этим методом даже из 2 мл культуры, практически не содержит хромосомной ДНК, и после проведения немногочисленных дополнительных этапов ее можно непосредственно использовать для анализа с помощью трех рестриктаз (разд. 15.3.1). Целиком все операции метода с дополнениями проводят следующим образом.

1. Выращивают в течение ночи 2 мл культуры в соответствующей среде (например, в сердечно-мозговом бульоне) на качалке в пробирках высотой 120 мм с завинчивающимися крышками. Для последующей обработки используют выросшие клетки или получают из них популяцию в логарифмической фазе роста, для чего культуру разводят 1 : 20 в 2 мл свежей среды и инкубируют ее дополнительно в течение 2—3 ч. Клетки собирают центрифугированием в течение 10 мин в настольной центрифуге Sorvall при 2500 g.

2. Ресуспендируют клетки в 2 мл буфера ТЭ (0,05 М трис-HCl, 0,01 М ЭДТА, pH 8,0), повторяют центрифугирование и тщательно ресуспендируют клеточный осадок в 40 мкл буфера ТЭ.

3. Не ранее чем за сутки готовят лизирующий буфер (4% ДСН в буфере ТЭ, pH 12,4). Важно точно измерить pH, так как при pH 12,5 происходит необратимая денатурация плазмидной ДНК. Наливают в 1,5-мл центрифужную пробирку (производятся фирмой Brinkmann Instruments; номер по каталогу 22-36-911-1) 0,6 мл лизирующего буфера, после чего пастеровской пипеткой вносят туда же 40 мкл клеточной суспензии. Суспензию хорошо перемешивают, не прибегая к помощи специальных перемешивающих устройств и избегая сильного взбалтывания. (Чтобы лишний раз не переносить куль-

туру, ее можно выращивать непосредственно в 1,5-мл центрифужной пробирке.)

4. Для полного лизиса клеток суспензию инкубируют в течение 20 мин при 37°C.

5. Нейтрализуют раствор добавлением 30 мкл 2,0 М триса, рН 7,0. Перемешивают его, медленными движениями переворачивая пробирку до тех пор, пока не станет изменяться вязкость раствора.

6. Хромосомную ДНК осаждают внесением такого количества NaCl (около 0,24 мл 5 М NaCl), чтобы создать в растворе конечную концентрацию 1 М. Это делают очень быстро. Для полного осаждения хромосомной ДНК пробирку ставят в лед на 4 ч. Если обследуется большое число культур и не нужно заботиться об особой чистоте плазмид, это время можно сократить до 1 ч.

7. С помощью микроцентрифуги (например, модель Eppendorf 5412) за 10 мин осаждают посторонний материал и переливают надосадочную жидкость в другую 1,5-мл пробирку (не следует стараться, чтобы на дне первой пробирки осталось как можно меньше жидкости).

8. Для осаждения ДНК добавляют к надосадочной жидкости 0,55 мл изопропанола. После перемешивания пробирку оставляют при —20°C на 30 мин.

9. ДНК осаждают центрифугированием в течение 3 мин на микроцентрифуге, надосадочную жидкость выливают, пробирку в перевернутом положении ставят на бумажную салфетку и затем ее содержимое высушивают под вакуумом.

10. Осадок суспендируют в 30 мкл буфера ТЭН (0,05 М трис, 0,005 М ЭДТА, 0,05 М NaCl, рН 8,0). ДНК растворяется в течение ночи при 4°C. Обычно при электрофорезе (100 В, 3 ч) 10 мкл этого раствора в 0,7%-ной агарозе с применением трис-боратной буферной системы получают хорошо видимые полосы ДНК.

Для анализа плазмидной ДНК рестриктазным расщеплением ее подвергают дальнейшей очистке (разд. 15.3.2) на следующих дополнительных этапах.

11. Полученный на 9-м этапе осадок суспендируют в 100 мкл 0,01 М триса, рН 8,0, добавляют 100 мкл фе-

нола, насыщенного 0,01 М трисом, рН 8,0, хорошо перемешивают и добавляют 100 мкл хлороформа.

12. Разделяют водную и фенол-хлороформную фазы центрифугированием в течение 30 с на микроцентрифуге. Водную фазу отбирают 100-мкл микропипеткой, стараясь не захватить слой, находящийся между фазами.

13. Плазмидную ДНК осаждают двумя объемами 95%-ного охлажденного во льду этанола и дальше действуют, как на 9-м этапе. Полученный осадок растворяют в буфере для соответствующей рестриктазы.

15.3. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

15.3.1. Электрофорез в геле

Для выявления и предварительной характеристики ДНК плазмид, присутствующих в клиническом материале или лабораторных штаммах грамотрицательных и грамположительных бактерий, подходят обычные методы электрофореза в геле с незначительными модификациями [10, 23]. Метод выделения плазмид с ДСН (разд. 15.1.3) широко применяется в сочетании с анализом ДНК гель-электрофорезом [26]. При этом, однако, в частично очищенных клеточных лизатах могут быть выявлены лишь те плазмиды, молекулярная масса которых лежит в пределах от $0,6 \cdot 10^6$ до $100 \cdot 10^6$. Мы же используем метод, описанный в разд. 15.2, который позволяет выявлять плазмиды с мол. массой от $0,6 \cdot 10^6$ до $350 \cdot 10^6$.

При электрофорезе плазмидной ДНК в геле расстояния, которые проходят разные виды молекул, находятся в обратной зависимости от значений их молекулярной массы. Во всех публикуемых в настоящее время методиках используются либо вертикальные, либо горизонтальные пластинки с гелем, регулируемые источники питания и источники коротковолнового ультрафиолетового света. Электрофорезу подвергают даже частично очищенные лизаты (как правило, достаточно 10—20 мкл).

Для электрофореза используют стандартный прибор, в котором вертикально расположенная пластина с ге-

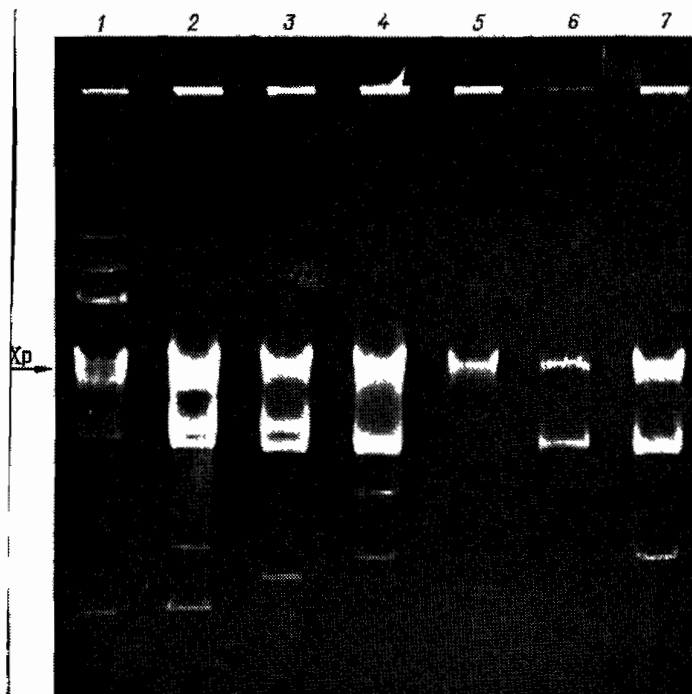


Рис. 15.1. Электрофорез в агарозном геле неочищенных лизатов, полученных из разных штаммов бактерий [8]. Образец 1 (слева): стандартные плазмидные ДНК с варьированием по мол. массе от $62 \cdot 10^6$ (самая верхняя полоса) до $1,8 \cdot 10^6$ (самая нижняя полоса). Образцы 2—7: плазмиды, содержащиеся в разных бактериальных штаммах. Хромосомная ДНК расположена в полосе, помеченной буквами Хр.

лем (размеры геля $100 \times 140 \times 2,5$ мм) имеет 12 лунок для нанесения проб ($6,5 \times 15 \times 2,5$ мм). Такой прибор можно купить (Aquebogue Machine and Repair Shop, P. O. Box 205, Aquebogue, NY1131) или изготовить в мастерских. Концентрация агарозы (тип Seakem ME, Marine Colloids, Inc., Rockland, Maine) в геле варьирует от 0,25 до 1,5% в стандартном буфере для электрофореза: 89 мМ трис, 2,5 мМ двунатриевая соль ЭДТА и 8,9 мМ борная кислота. Электрофорез проводят обычно

в течение 2 ч при комнатной температуре, напряжении 120 В и силе тока 60 мА. Затем гель помещают в раствор бромистого этидия (0,4—1,0 мкг/мл) на 15 мин, после чего ДНК выявляют в дальнем ультрафиолете.

На рис. 15.1 показана фотография одного такого геля (0,7%-ная агароза). Полоса Хр соответствует хромосомной ДНК, находящейся в частично очищенном препарате. В первом образце кроме этой полосы имеется несколько полос, соответствующих плазмидной ДНК с разными, но известными молекулярными массами из различных штаммов бактерий; эти ДНК используются в качестве стандартов. При построении графической зависимости в логарифмических координатах перемещения в геле плазмидной ДНК от молекулярной массы этой ДНК получают прямую линию в пределах от $100 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^6$. Интерполяцией можно получить значения молекулярной массы плазмид из различных бактерий.

Для определения молекулярной массы неизвестных плазмид с помощью электрофореза в агарозном геле в качестве стандартов используют плазмиды, молекулярная масса которых известна (табл. 15.1). Чтобы выявить плазмиды с большой молекулярной массой, клетки лизируют по методу, описанному в разд. 15.2. Для удоб-

Таблица 15.1. Плазмиды, используемые в качестве стандартов молекулярной массы, и бактерии, служащие их источником

Бактерия ^a	Молекулярная масса плазмидной ДНК ($\cdot 10^6$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO2 (pMG1)	312
<i>P. aeruginosa</i> PAO2 (pMG5)	280
<i>Escherichia coli</i> DT78 (TP116)	143
<i>E. coli</i> DT41 (R27)	112
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	60
<i>P. aeruginosa</i> PAO2 (RP1)	38
<i>E. coli</i> K-12 J5-3 (Sa)	26
<i>E. coli</i> K-12 W1485-1 (RSF2124)	7,4
<i>E. coli</i> K-12 W1485-1 (RSF1010)	5,5
<i>E. coli</i> JC411 (ColE1)	4,2
<i>E. coli</i> W1485-1 (PMB8)	1,8

^a Эти штаммы можно получить у Э. Ледерберг, Plasmid Reference Center, Department of Medical Microbiology, Stanford University Medical School, Stanford, CA 94305 (telephone 415/321—2300).

ства рекомендуется разделять раствор плазмидной ДНК, полученный для каждого из штаммов, на порции объемом по 20 мкл и хранить их при -20°C .

15.3.2. Гель-электрофорез

Рестриктаза катализирует расщепление двухцепочечной ДНК в специфических сайтах узнавания [1, 29], причем места расщепления в разных цепях смещены относительно друг друга. В случае фермента *Eco* R1, например, специфическая нуклеотидная последовательность, которую он узнает, выглядит так:



где стрелки указывают места расщепления. Плазмидная ДНК (как и любая другая в этом отношении) после обработки эндонуклеазой дает характерный набор фрагментов, зависящий от числа и расположения в геноме специфических сайтов узнавания. Эти фрагменты разделяют электрофорезом в агарозном геле. Сравнение картин разделения фрагментов, полученных из разных плазмид, позволяет качественно оценивать степень их родства. Фрагменты ДНК можно также перенести из агарозного геля на полоску нитроцеллюлозы (перенос материала из геля на бумагу называется блоттингом), а если провести их гибридизацию с радиоактивно меченым образцом ДНК, можно выявить фрагменты, содержащие последовательности, гомологичные последовательностям образца; гомологичные фрагменты выявляются при радиоавтографии в виде резких полос на нитроцеллюлозной полоске [28].

К настоящему времени описано около 150 различных рестриктаз; некоторые из них производятся в промышленных масштабах (Bethesda Research Laboratory, Rockville, MD 20850; Miles Laboratories, Inc., Elkhart, IN 46514; New England Biolabs, Beverly, Ma 01915). Для оптимального функционирования каждой рестриктазы нужны особые условия, которые обычно указываются

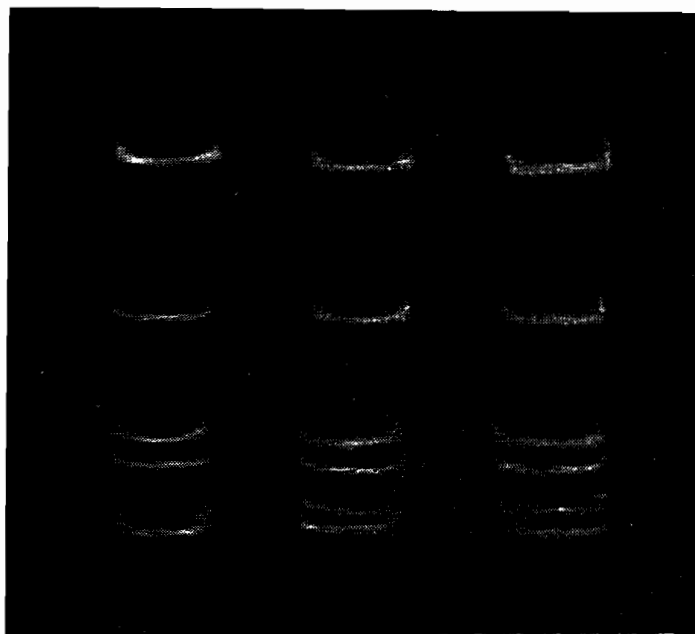


Рис. 15.2. Наборы полос, получаемые при обработке плазмид Ap^r из разных энтеробактерий рестриктазой Hinc [8]. Обработку и электрофорез проводили, как описано в разд. 15.3.2. Гель окрашивали бромистым этидием. Картина люминесценции, возникающая в результате интеркаляции красителя при освещении ультрафиолетом, сфотографирована на пленку «Поляронд».

изготовителем. Полезность анализа с применением рестриктаз мы проиллюстрируем на следующем примере.

Кроза и др. [8] исследовали ряд устойчивых к ампициллину штаммов, относящихся к 1-му типу *Shigella dysenteriae*, которые были выделены во время разных эпидемий. Во всех случаях детерминанта устойчивости к ампициллину принадлежала плазмиде с мол. массой $5,5 \cdot 10^6$. На рис. 15.2 показаны картины разделения фрагментов плазмидной ДНК, полученных после обработки рестриктазой Hinc II. Во всех пробах была обнаружена сходная плазмидная ДНК с мол. массой $5,5 \cdot 10^6$. Такой результат свидетельствует о том, что изучаемые плазмиды гомологичны.

Для расщепления плазмидной ДНК рестриктазой *Hinc* II использовали следующую методику.

1. Обработывали 20 мкл очищенной плазмидной ДНК ($\sim 0,2$ мкг ДНК) в буфере (10 мМ трис-HCl, 50 мМ NaCl, 6 мМ 2-меркаптоэтанол, 6 мМ $MgCl_2$, pH 7,0) рестриктазой *Hinc* II (New England Biolabs; 2000 ед. акт./мл), которую добавляли в количестве 2 ед. акт.

2. Реакционную смесь инкубировали 90 мин при 37°C.

3. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл водного раствора 0,07%-ного бромфенолового синего, 7%-ного ДСН и 33%-ного глицерина.

4. Проводили электрофорез всей реакционной смеси в 0,7%-ном агарозном геле, как описано в разд. 15.3.1.

5. Сравнивали картины полос фрагментов после окрашивания бромистым этидием (разд. 15.3.1).

В некоторых случаях крайне желательно экстрагировать разделенные в агарозном геле фрагменты. Они могут понадобиться для исследования химическими и физическими методами, а также для установления деталей структуры рестрикционным анализом, определения последовательности оснований в ДНК, гетеродуплексного анализа и гибридизации с использованием эндонуклеазы [6] или блоттинга методом Саузерна [28]. Приводимая ниже методика [11] позволяет экстрагировать с хорошим выходом всевозможные интактные, биологически активные молекулы ДНК непосредственно из полос, которые они образуют в агарозном геле. Для осуществления этой операции нужен выпускаемый промышленностью препарат агаразы (Calbiochem, La Jolla, Calif., номер по каталогу 121811) — фермента, расщепляющего агарозу.

1. Гидролиз эндонуклеазой и электрофорез в агарозе с окраской бромистым этидием (разд. 15.3.1) описаны выше. Фрагменты ДНК, разделенные в 0,6%-ном агарозном геле (трубочка диаметром 0,6 см и длиной 11 см), выявляют в ультрафиолете, а диски геля с этими фрагментами вырезают бритвенным лезвием. Можно одновременно обрабатывать несколько вырезанных дисков (по 0,05—0,1 г каждый) с одним и тем же фрагментом.

2. Разрушают диск геля в 0,1 М трисе, рН 5,95 (0,1 мл на диск). Суспензию гомогенизируют, набирая и выпуская ее трижды пластмассовым шприцем (без иглы) объемом 1 мл в центрифужный стакан из пирекса.

3. Добавляют раствор агаразы (50 мкг на диск) в 0,1 М трис-НСl, рН 5,95 (концентрация фермента 1 мг/мл), и инкубируют 2 ч при 37 °С.

4. Удаляют агарозу центрифугированием при 48 000 g в течение 30 мин при 4 °С.

5. При необходимости надосадочную жидкость, содержащую ДНК, можно сконцентрировать осаждением двумя объемами этанола или диализом против полиэтиленгликоля.

6. Перед концентрированием проводят дополнительную очистку препарата пропусканием надосадочной жидкости через фильтр Swinnex (Millipore Corp., Bedford, Mass.) с размером пор 0,45 мкм.

При получении ДНК этим методом выход составляет ~75—80% для плазмидной ДНК с мол. массой $7,4 \cdot 10^6$ — $60 \cdot 10^6$ и для фрагментов, полученных под действием рестриктазы *Eco* RI с размерами от $0,75 \cdot 10^6$ до $13,9 \cdot 10^6$. ДНК, экстрагируемая с помощью агаразы, вызывает трансформацию фактически с той же частотой (для клеток *E. coli*), что и ДНК, не контактировавшая с этим ферментом. Извлеченные из гелей фрагменты ДНК с успехом использовались в экспериментах по клонированию в качестве источника или носителя генетической информации [11].

15.3.3. Центрифугирование в градиенте плотности (с использованием бромистого этидия)

Молекулы плазмидной ДНК, полученные из клеток бактерий, представляют собой двухцепочечные ковалентно замкнутые кольцевые структуры, не имеющие свободного конца, вокруг которого они могли бы раскручиваться. Бромистый этидий, относящийся к ряду фенатридиновых красителей, связывается с ДНК и РНК и тормозит функционирование нуклеиновых кислот [5, 15]. Клетки лизируют и лизаты наносят на градиенты хлористого цезия, содержащие бромистый этидий. При высокоскоростном центрифугировании ДНК седименти-

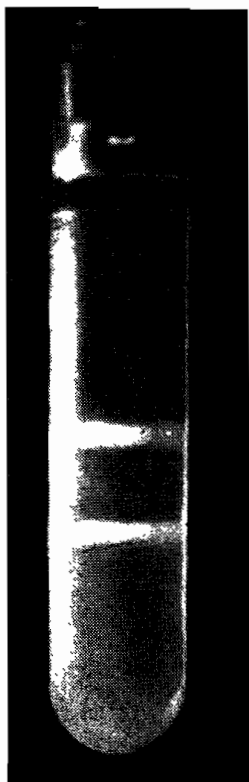


Рис. 15.3. Результат центрифугирования бактериального лизата, полученного при добавлении тритона X-100, в цезий-этидиевом градиенте. При освещении ближним ультрафиолетовым светом видны две полосы люминесценции интеркалировавшего в ДНК бромистого этидия. Верхняя полоса соответствует хромосомной ДНК, нижняя — плазмидной ДНК.

Таблица 15.2. Компоненты смеси, добавляемые при центрифугировании в цезий-этидиевом градиенте плотности

Состав пробы	Тип ротора	
	50	Ti-60
Лизат	3,2 мл	24 мл
ТЭН-буфер	2,0 мл	3 мл
CsCl	4,9 г	23 г
Бромистый этидий	0,2 мл	1 мл

рует до установления равновесия. Встраиваясь в молекулу ДНК, бромистый этидий уменьшает ее плотность [3, 25]. Линейная молекула ДНК или разомкнутая кольцевая (с разрывом в одной цепи) молекула плазмидной ДНК не имеет тех физических ограничений, которые характерны для ковалентно замкнутой кольцевой (КЗК) плазмидной ДНК. Вследствие этого первые ДНК связывают значительно больше молекул бромистого этидия и их плотность становится меньше, чем плотность КЗК-ДНК. Эта разница в связывании красителя позволяет разделять разные формы плазмидной ДНК. В градиентах хлористого цезия формы с встроенным

бромистым этидием благодаря люминесценции последнего могут быть визуально зафиксированы в ультрафиолетовом свете в виде дискретных полос (рис. 15.3).

Для осуществления методики, приведенной ниже, требуются препаративная ультрацентрифуга, переносной источник ультрафиолетового света (Black Ray, UVL-22; Ultraviolet Products, Inc., San Gabriel, Calif.), градиентатор и рефрактометр (Abble 3L, Bausch and Lomb, Inc., Rochester, NY). Материал, выделенный с помощью тритона X-100 (разд. 15.1.2), можно, к примеру, обработать следующим образом.

1. В полиалломерный центрифужный стакан размером 1,6×7,6 см центрифуги Вексман вносят 5 г хлористого цезия, 2 мл буфера ТЭН и 3,2 мл клеточного лизата.

2. Перемешивают содержимое стакана до полного растворения хлористого цезия и добавляют 0,2 мл раствора бромистого этидия (10 мг/мл в ТЭН-буфере).

3. Измеряя показатель преломления раствора, доводят его плотность до $1,3925 \pm 0,001$ г/см³ добавлением ТЭН-буфера или сухого хлористого цезия. Показатель преломления измеряется с ошибкой и может быть разным при измерении разными приборами, поэтому рекомендуется в пробных экспериментах стандартизировать измерения. При необходимости в стаканы доливают минеральное масло.

4. Подготавливают стаканы к ультрацентрифугированию, согласно предписанию фирмы-изготовителя, и ставят их в соответствующий ротор. Стаканы должны быть хорошо уравновешены.

В соответствии с объемом лизата можно использовать полиалломерные стаканы любого размера. Например, при крупномасштабном выделении с использованием тритона получают 20 мл лизата, которые можно центрифугировать в полиалломерном стакане для ротора Вексман Ti-60. А если объем лизата около 10 мл, то можно провести центрифугирование в полиалломерном стакане для 65-го ротора (Вексман). В табл. 15.2 указаны различные соотношения буфера ТЭН, хлористого цезия и бромистого этидия.

5. Центрифугирование проводят со скоростью 40 000 об/мин при 15 °С в течение по крайней мере 44 ч

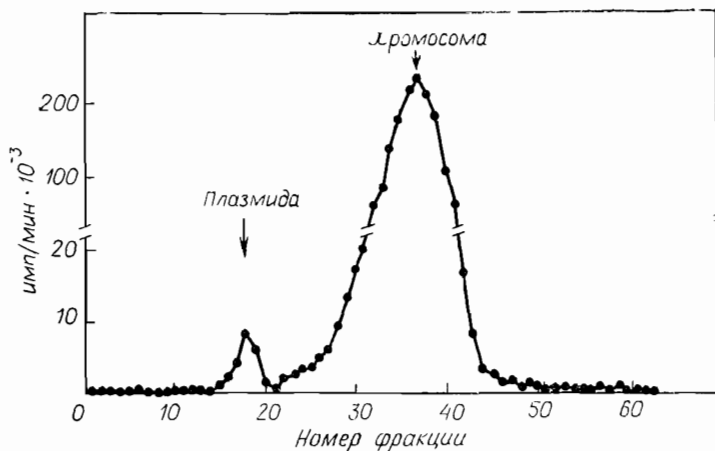


Рис. 15.4. Определение числа копий плазмид. Бактериальный штамм, содержащий плазмиды, был выращен на минимальной солевой среде с добавкой казаминовых кислот и глюкозы. После введения метки и лизиса полученный лизат был отцентрифугирован в цезий-этидиновом градиенте, как описано в разд. 15.3.3. Фракции (по семь капель каждая) собирали в емкости для микротитрования и измеряли в них радиоактивность.

в препаративной ультрацентрифуге Вескман (или какой-либо аналогичной ей). После центрифугирования просматривают стаканы с градиентами в ультрафиолете в поисках полос, люминесцирующих благодаря образованию комплексов ДНК с бромистым этидием. Отбирают плазмидную ДНК (нижняя полоса в градиенте на рис. 15.3) через дно стакана, пользуясь каким-либо прибором для фракционирования градиентов.

6. Когда в опыт берут радиоактивный препарат ДНК, фракции проверяют на радиоактивность. Типичный профиль распределения радиоактивности, показанный на рис. 15.4, свидетельствует о четком разграничении фракций плазмидной ДНК с большей плотностью и хромосомной ДНК с меньшей плотностью.

7. Освобождают ДНК от бромистого этидия, экстрагируя препарат не менее четырех раз изопропанолом, насыщенным хлористым цезием.

8. Диализуют препарат ДНК против соответствующего буфера, чтобы удалить хлористый цезий.

9. Разделяют очищенную плазмидную ДНК на несколько порций и хранят при -20°C .

Метод лизирования клеток с последующим центрифугированием в градиенте плотности можно использовать для выяснения вопроса о том, содержит ли данный бактериальный штамм плазмидную ДНК. Правда, данный метод требует дорогостоящего оборудования и больших затрат времени, к тому же с его помощью можно проверить одновременно лишь относительно небольшое число культур. Однако это лучший метод очистки плазмидных ДНК в количествах, достаточных для дальнейшего анализа.

Некоторые рекомендации по поводу центрифугирования в градиенте плотности.

1. Чтобы полностью устранить загрязнение хромосомной ДНК (верхняя полоса в градиенте, рис. 15.3), проводят вторичное центрифугирование собранной плазмидной ДНК в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием. Собирают плазмидную ДНК, вновь образовавшую полосу, с помощью раскапывания градиента со дна стакана или шприцем, проколов иглой стенку стакана.

2. Бромистый этидий добавляют после CsCl, так как релаксирующие белки, которые присутствуют в некоторых плазидах и образуют одноцепочечные разрывы в ДНК, могут активироваться бромистым этидием [20]. CsCl в высокой концентрации (7 М) инактивирует релаксационные белки [20] в плазидах, благодаря чему можно получить больший выход ДНК.

3. Одноцепочечные разрывы плазмидной ДНК даже при высоких концентрациях соли может вызывать видимый свет (в присутствии бромистого этидия), поэтому все операции должны проводиться в отсутствие прямого освещения.

4. Формирования четких полос и хорошего разделения плазмидной и хромосомной ДНК можно достичь центрифугированием в течение ночи в роторе Beckman № 65 со скоростью 45 000 об/мин при 15°C . Разработанные недавно новые модели роторов позволяют разделять плазмидную и хромосомную ДНК еще быстрее.

Определение числа плазмидных копий

Число копий какой-либо плазмиды, приходящееся на одну хромосому, представляет собой характеризующий плазмиду параметр, который дает информацию о способе ее репликации.

Число плазмидных копий можно установить центрифугированием меченного ^3H -тимином клеточного лизата в градиенте хлористого цезия с бромистым этидием. Для подсчета числа копий используют приводимое ниже отношение между плазмидным и хромосомным пиками:

$$\text{Число копий} = \frac{\text{Радиоактивность (имп/мин) плазмидного пика}}{\text{Радиоактивность (имп/мин) хромосомного пика}} \cdot \frac{MW_x}{MW_p},$$

где MW_x и MW_p — молекулярные массы хромосомы и плазмиды соответственно.

Для тиминзависимого штамма в ростовую среду к соответствующему количеству тимина добавляют ^3H -тимин (7 мкКи/мл). Для тиминнезависимого штамма в ростовую среду добавляют 1 мкг/мл тимина, 250 мкг/мл дезоксиаденозина и 7 мкКи/мл ^3H -тимина.

Методика включает следующие операции.

1. Выращивают культуру (1 мл) штамма, содержащего плазмиду, при 37°C в присутствии 7 мкКи/мл ^3H -тимина до плотности, равной $2 \cdot 10^8$ клетка/мл.

2. Клетки осаждают центрифугированием, промывают их в ТЭ-буфере (0,01 М трис- HCl , 0,001 М ЭДТА, рН 8,1) и ресуспендируют в 400 мкл 0,5 М сахарозы (высокоочищенная, не содержащая рибонуклеазы сахара в 50 мМ трисе, рН 8,0).

3. К суспензии клеток добавляют 0,2 мл 0,2 М ЭДТА, рН 7,8, и хорошо перемешивают.

4. Добавляют 0,2 мл 1%-ного лизоцима (в 0,25 М трисе, рН 8,0) и хорошо перемешивают. Немного встряхивают и ставят в лед на 15 мин.

5. Добавляют к суспензии 1,2 мл 1,2%-ного саркозила, после чего немедленно вносят 0,1 мл проназы (1 мг/мл) в 0,01 М трисе, 0,02 М ЭДТА, рН 8,1. Проназу следует предварительно проинкубировать 2 ч при 37°C для самопереваривания, а затем прогреть перед использованием 2 мин при 80°C . Смесь осторожно пе-

ремешивают и инкубируют при 37 °С до тех пор, пока суспензия полностью не просветлится.

6. Быстро набирают и выдувают обратно раствор ДНК 5-мл пипеткой (для получения фрагментированной хромосомной ДНК), пока раствор не перестанет быть вязким.

7. Центрифугируют 5 мл образца ДНК с радиоактивностью около 500 000 имп/мин в цезий-этидиевом градиенте. В данном случае показатель преломления должен быть на 0,0025 меньше, чем в случае градиента для тритиевого лизата. Центрифугируют также образец ДНК в линейном градиенте сахарозы (от 5 до 20%).

8. Раскапывают градиенты по дискам фильтровальной бумаги Whatman 3ММ.

9. Осаждают радиоактивную ДНК холодной 5%-ной ТХУ, содержащей 50 мкг/мл тимина, промывают фильтры 95%-ным этанолом и высушивают. Радиоактивность измеряют в сцинтилляционном счетчике.

На рис. 15.4 изображен профиль радиоактивности разделенной в цезий-этидиевом градиенте общей клеточной ДНК из штамма *E. coli*, содержащего плазмиду.

Рекомендация по определению числа плазмидных копий

1. В одном и том же градиенте можно выявить как ковалентно замкнутые кольцевые молекулы ДНК (КЗК-ДНК), так и отличные от них плазмидные открытые кольцевые молекулы ДНК (ОК-ДНК). Они разделяются в цезий-этидиевом и сахарозном градиентах. Например, димеры двух КЗК-молекул ДНК мигрируют вместе с мономерами КЗК-ДНК в цезий-этидиевом градиенте, а в сахарозном градиенте осаждаются порознь. Димеры, состоящие из одной КЗК- и одной ОК-молекулы, в цезий-этидиевом градиенте дают полосу в промежуточном положении между мономерами КЗК- и ОК-молекулами. Димеры двух ОК-молекул ДНК мигрируют в цезий-этидиевом градиенте вместе с мономерами ОК-ДНК, но дают отдельную от них полосу в градиенте сахарозы.

2. Градиенты сахарозы можно готовить при помощи градиентной смесительной камеры. Другой способ за-

ключается в приготовлении раствора сахарозы с концентрацией, средней между крайними концентрациями желаемого градиента с последующим замораживанием его при -20°C . Если такой раствор медленно оттаивает в течение ночи при 4°C , то при этом получается подходящий для аналитических целей градиент. Например, замороженный раствор 12,5%-ной сахарозы после оттаивания даст градиент приблизительно от 5 до 20%.

15.3.4. Выявление гомологии

(с использованием эндонуклеазы, специфически расщепляющей одноцепочечную ДНК)

Основой для любого изучения гомологии является диссоциация двухцепочечной плазмидной ДНК и последующий специфический отжиг одноцепочечной ДНК из гомологичного или гетерологичного источника (реассоциация ДНК). Плазмидные гомо- и гетеродуплексы анализируют с помощью специфичной по отношению к одноцепочечной ДНК эндонуклеазы S1 из *Aspergillus oryzae*. Приводимая ниже методика [6] позволяет точно и быстро определять, насколько гомологичны или гетерологичны полинуклеотидные последовательности. Это особенно полезно для проведения экспресс-анализов и для других исследований, в которых требуется постановка большого числа проб на гибридизацию ДНК — ДНК.

В качестве стандарта используют очищенную радиоактивно меченную ДНК, которую гибридизуют с очищенной суммарной клеточной ДНК из штаммов, содержащих плазмиды. ДНК какого-либо штамма, не содержащего плазмиды, служит контролем. Для проведения реакций реассоциации ДНК — ДНК, оцениваемых методом с применением эндонуклеазы S1, фрагментированную денатурированную очищенную плазмидную ДНК с радиоактивностью 5000—10 000 имп/мин (обычно это меньше 0,001 мкг ДНК) инкубируют со 150 мкг нефракционированной суммарной фрагментированной денатурированной бактериальной ДНК из штаммов, содержащих и не содержащих плазмиды, в 0,42 М NaCl в общем объеме 1 мл. Такие смеси инкубируют при температуре, которая зависит от суммарного процентного содержания гуанина и цитозина (G+C) в плазмидной ДНК. В слу-

чае гомологии реассоциация осуществляется фактически полностью. Время, необходимое для полной реассоциации плазмидной ДНК, представляет собой функцию ее молекулярной массы и концентрации ионов. Время реассоциации определяют, вычисляя значение $C_0 t_{1/2}$, где C_0 — начальная концентрация ДНК, $t_{1/2}$ — время достижения 50%-ной реассоциации ДНК (при концентрации C_0) для данной температуры, концентрации соли и размера фрагментов ДНК. Эмпирическая формула [7] имеет вид

$$C_0 t_{1/2} = \frac{\text{Молекулярная масса плазмидной ДНК}}{3 \cdot 10^7}.$$

Время инкубации, требуемое для получения полной реассоциации в присутствии 0,42 М NaCl, равно приблизительно $8 C_0 t_{1/2}$. Таким образом,

$$8 C_0 t_{1/2} = C_0 t_x,$$

где C_0 — начальная концентрация плазмидной ДНК (которую можно вычислить или оценить, исходя из числа копий плазмиды), а t_x — время реассоциации.

В оптимальных условиях при инкубации только одной меченой плазмидной ДНК реассоциация цепей этой ДНК друг с другом (самореассоциация) должна составлять менее 10%, в то время как в присутствии гомологичной ей немеченой ДНК реассоциировать должно более 85%. В каждом эксперименте измеряют также реассоциацию меченой плазмидной ДНК с ДНК не несущих плазмид бактериальных клеток и вычитают величину этой реассоциации (около 10% или меньше) из величин реассоциации, определенных для каждой реакции.

Гибридизация

1. Смесь для реассоциации: 150 мкг немеченой, обработанной ультразвуком суммарной клеточной ДНК; меченая обработанная ультразвуком плазмидная ДНК с радиоактивностью 5000—10 000 имп/мин; NaCl в количестве, достаточном для создания концентрации 0,42 М в общем объеме 1,0 мл.

2. ДНК денатурируют кипячением в этой смеси в течение 10 мин и затем раствор ДНК помещают в лед.

3. Инкубируют смесь для реассоциации при температуре 55—70°C, зависящей от процентного содержания G+C в плазмидной ДНК.

Плазмидную ДНК, меченную ^3H -тимином, выделяют в виде КЗК-ДНК методом, в котором для лизиса клеток используется тритон (разд. 15.1.2). Можно также ДНК пометить *in vitro*. Удельная активность меченой ^3H -тимином ДНК, получаемой этим методом, обычно составляет $\sim 10^6$ имп/мин/мкг. Эту плазмидную ДНК подвергают обработке ультразвуком, чтобы получить фрагменты с мол. массой $\sim 2,5 \cdot 10^5$.

Суммарную клеточную ДНК готовят, как описано в гл. 15. Эту ДНК также фрагментируют с помощью ультразвука до величин мол. массы $\sim 2,5 \cdot 10^5$.

Реакция с эндонуклеазой S1

Эндонуклеаза S1 с очень хорошей активностью имеется в продаже (Sigma, номер по каталогу 5255).

1. Готовят исходную реакционную смесь (назовем ее S1-реакционной смесью): 0,125 мМ ZnSO_4 , 87,5 мМ NaCl, 37,5 мМ Na-ацетатный буфер, pH 4,5, 25 мкг/мл ДНК (из тимуса теленка) — и хранят ее замороженной при -20°C в аликвотах по 0,8 мл. В реакционную смесь при проведении эксперимента входит 0,8 мл S1-реакционной смеси и 0,2 мл смеси для реассоциации. Конечные концентрации веществ в пробе составляют: 0,1 мМ ZnSO_4 , 150 мМ NaCl (с учетом NaCl, внесенного с 0,2 мл смеси для реассоциации), 30 мМ Na-ацетатный буфер, pH 4,5, и 20 мкг/мл ДНК из тимуса теленка. Для каждой реакции реассоциации ставят две пробы с обработкой эндонуклеазой S1 и две пробы без обработки ферментом.

2. Добавляют 187,5 ед. акт. эндонуклеазы S1, чтобы запустить реакцию, и инкубируют 20 мин при 50°C .

3. Останавливают реакцию, помещая пробирки со смесями в ледяную баню; в качестве соосадителя добавляют 50 мкг ДНК из тимуса теленка (в данном случае подходит любая имеющаяся в продаже не очень чистая ДНК) и 0,3 мл холодной 20%-ной ТХУ. Выпавший осадок собирают фильтрованием под вакуумом на мембранный фильтр (тип HA, Millipore Corp.). Фильтры вы-

Таблица 15.3. Определение гомологии между гетерологичными плазмидами при помощи эндонуклеазы, образующей разрывы в одной цепи ДНК

№	Образец	Радиоактивность после обработки нуклеазой S1, имп/мин ^а		Процент в опыте	Усредненный процент	Процент гомологии, приведенный и с поправкой ^б
		с ферментом	без фермента			
1.	³ H-ДНК плазмиды, денатурированная нагреванием	20 18	821 832	2,4 2,2	2,3	
2.	Денатурированная нагреванием и реассоциированная плазмидная ³ H-ДНК	50 53	850 890	6,0 6,0	6,0	
3.	Реассоциировавшая смесь денатурированных нагреванием плазмидной ³ H-ДНК и суммарной клеточной ДНК, содержащей эту плазмидную ДНК	790 798	850 825	92,9 96,7	94,8	100
4.	Реассоциировавшая смесь денатурированных нагреванием плазмидной ³ H-ДНК и суммарной клеточной ДНК, содержащей гетерологичную плазмиду	45 63	820 881	5,5 7,1	6,3	<0,3
5.	Реассоциировавшая смесь денатурированных нагреванием плазмидной ³ H-ДНК и суммарной клеточной ДНК из штамма, не содержащего плазмиды	60 62	860 880	7,0 7,0	7,0	<1

^а Значения радиоактивности были получены после вычитания фона 20 имп/мин.

^б Цифры в этой колонке получены путем вычитания цифр в строке 2 из соответствующих цифр в строках 3, 4 и 5 и последующим делением на цифру в строке 3.

сушивают при 70 °С и определяют радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Контроли должны включать пробу с меченой *in vivo* плазмидной ДНК, по которой можно выявлять любое количество присутствующей в препарате нуклеазы, производящей двухцепочечные разрывы; пробу, содержащую только денатурированную и реассоциированную меченую ДНК, которая служит контролем самореассоциации меченой ДНК в условиях опыта; пробу с денатурированной меченой ДНК, по которой судят об активности препарата эндонуклеазы S1. В табл. 15.3 показано, как обработать исходные данные по радиоактивности, чтобы получить процент гомологии ДНК. Результаты выражены в виде процентов необработанных контролей по отношению к величинам, полученным для гомологичной реакции.

15.3.5. Определение гомологии цепей ДНК с помощью электронной микроскопии

Если двум частично комплементарным цепям плазмидной ДНК дать возможность ренатурировать, то образуются гетеродуплексные молекулы, которые можно исследовать с помощью электронного микроскопа. Поскольку при электронно-микроскопическом анализе в случае соответствующего приготовления образцов одно- и двухцепочечные участки нуклеиновых кислот различаются, существует возможность картирования гомологичных и негомологичных участков. С тех пор как в практику вошли способы проверки с применением рестриктаз и методы выявления гомологий ДНК в растворе по радиоактивности, методология гетеродуплексного анализа с помощью электронного микроскопа перестала широко применяться для анализа плазмидной ДНК. Хотя техника такого анализа требует большого экспериментального искусства и специального оборудования, она все же заслуживает рекомендации как способ точной локализации различий между плазмидами и наилучшей оценки организации плазмидной ДНК.

По стандартной методике Кляйншмидта [18] к ДНК прикрепляют основной белок, и она переходит в образованный денатурированными белками монослой, создаваемый на разделе фаз вода — воздух. Одноцепочечная

ДНК сворачивается и на электронной микрофотографии имеет вид «куста». Однако в присутствии формамида одноцепочечные участки более или менее расправляются, и в этих условиях их можно увидеть и отличить от двухцепочечных. Таким образом, добавление формамида позволяет измерять одноцепочечные и двухцепочечные участки ДНК и служит основой для анализа формирования гетеродуплексов из цепей плазмидных ДНК. Методику Кляйншмидта с успехом применяют для определения молекулярных масс плазмидной ДНК путем измерения длины контура хорошо расправленных раскрытых, кольцевых или линейных, двухцепочечных молекул плазмидной ДНК.

Если эксперименты по получению гетеродуплексов начинают с КЗК-ДНК, желательно ввести одноцепочечный разрыв таким образом, чтобы при денатурации образовались две интактные молекулы — одноцепочечная линейная и одноцепочечная кольцевая. Этого достигают следующим образом: сначала отделяют КЗК-молекулы от всех других и затем производят слабую обработку дезоксирибонуклеазой или облучают видимым светом в присутствии бромистого этидия [3]. При такой слабой обработке образуются лишь одноцепочечные разрывы. КЗК-ДНК плазмид можно также расщеплять рестриктазами в условиях, когда расщепление происходит только по одному месту. Денатурацию обычно проводят прогреванием или обработкой щелочью. Способ, применяемый для денатурации ДНК, должен быть достаточно эффективным для того, чтобы привести к полному расхождению цепей, однако воздействие не должно быть настолько сильным, чтобы вызвать деградацию ДНК и внести дополнительные разрывы. Для ренатурации в водном растворе требуется высокая концентрация соли и нагревание до температуры примерно на 30°C ниже температуры плавления (T_m). Однако и соль в высокой концентрации, и высокая температура могут привести к одноцепочечным разрывам. Поэтому ренатурацию лучше осуществлять с формамидом — растворителем, эффективно снижающим T_m . При этом пригодны достаточно разведенные растворы ДНК, а реакцию можно проводить при температуре, равной или ниже комнатной, в течение более длительного времени. Оптимальна рена-

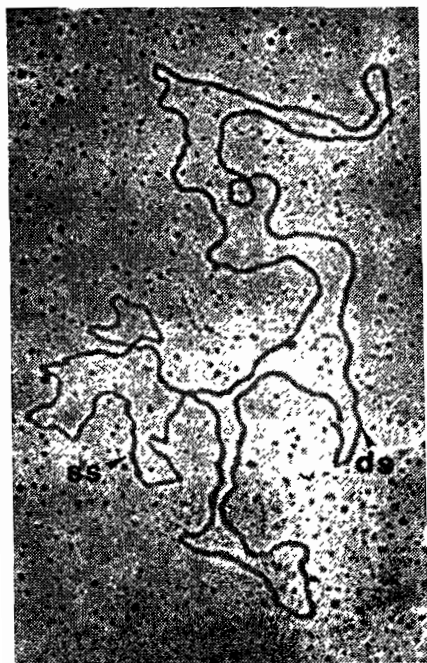


Рис. 15.5. Образование гетеродуплекса между R-плазмидой R6K и ее делеционным мутантом RSF1040 [7]. Гетеродуплексные молекулы ДНК получали из ДНК двух плазмид, подвергавшихся одноцепочечному разрыву под действием рентгеновских лучей по методике, описанной в разд. 15.3.5. Петля слева представляет собой одноцепочечную (ss) ДНК плазмиды R6K, которая отсутствует из-за делеции в плазмиде RSF 1040. Большая петля справа — двухцепочечная ДНК (ds), по которой можно рассчитать область гомологии обеих плазмид. В данном случае двухцепочечная область составляет около 70% ДНК плазмиды R6K.

турация приблизительно 50% взятой ДНК, так как продукты ренатурации смеси родственных молекул ДНК состоят из неренатурировавших одноцепочечных фрагментов, гомодуплексов или гетеродуплексов. Поэтому кинетика ренатурации такова, что по достижении 50—75%-ного уровня реассоциации происходит предпочтительное образование гомодуплексов, а не желаемых гетеродуплексов. На рис. 15.5 изображен типичный гетеродуплекс молекул плазмидной ДНК, имеющих одноцепочечный разрыв, и ее делеционной мутантной формы. Двухцепочечные и одноцепочечные области достаточно хорошо различаются.

В основе любого электронно-микроскопического анализа ДНК лежит приготовление мономолекулярного слоя нуклеиновой кислоты. Для этого на поверхности водного раствора создается пленка белка (цитохрома *c*). Денатурированный на поверхности белок образует нерастворимую пленку, которую можно рассматривать как

мономолекулярный слой. ДНК адсорбируется на белковой пленке и вследствие этого переходит из трехмерной конфигурации в растворе в двумерную на пленке. Затем монослой с ДНК переносят в виде пленки на твердую подложку, покрывающую сетку для образцов,готавливаемых для электронной микроскопии. Подложки обычно изготавливают из парлодия или производных нитроцеллюлозы.

Для улучшения контраста образец натеняют солями урана; применяется также натенение металлами, для того чтобы увеличить различие в контрастности между двухцепочечными и одноцепочечными участками ДНК. (Подробное описание методов электронной микроскопии см. в гл. 4.) Следует избегать чрезмерного натенения, поскольку при этом из-за неровностей подложки и слишком толстого слоя металла, напыленного на участках, представляющих собой фон, разница в контрасте между фоном и объектом и между одноцепочечными и двухцепочечными ДНК уменьшится. В литературе описаны разные методики [18] приготовления белкового монослоя (например, методика растягивания, диффузионная методика, методика «высвобождения в один этап»). В случае методики растягивания кювету наполняют соответствующей гипофазой и на ее поверхность под углом (например, с предметного стекла) наносят раствор с белком и нуклеиновой кислотой.

Для определения гомологии плазмидных ДНК при помощи электронной микроскопии рекомендуется следующий метод.

1. 0,1 мкг каждой из двух ДНК, взятых для образования гетеродуплексов, помещают в маленькую пробирку типа Eppendorf (West Coast Scientific Co., P. O. Box 2947, Rockridge Station, Oakland, CA 94618; номер по каталогу 3810). ДНК денатурируют добавлением 0,25 мл 0,1 М NaOH, 0,02 М Na₂-ЭДТА и достаточного количества 10 М NaOH (1—5 мкл) до установления pH в пределах 12,4—12,6. Выдерживают ДНК в этом растворе при комнатной температуре в течение 10 мин.

2. Раствор нейтрализуют добавлением 25 мкл 1,8 М трис-HCl, 0,2 М трис-основания и 0,25 мл формамида (Mallinckrodt, 99%). Значение pH должно находиться между 8,4 и 8,6. Если это не так, то добавляют еще

2 мкл трис-буфера (при $pH > 8,6$) или 2 мкл NaOH (при $pH < 8,4$).

3. Позволяют денатурированной плазмидной ДНК ренатурировать в течение 1,5 ч. Для прекращения ренатурации раствор охлаждают до $0-4^{\circ}C$ и диализуют против 0,01 М трис-HCl и 0,001 М ЭДТА, pH 7—8,5, при $4^{\circ}C$ 2 ч. Раствор, в котором прошла ренатурация, можно хранить при $4^{\circ}C$ и отбирать из него пробы в любой момент в течение 1 мес, хотя ДНК в этом растворе продолжает ренатурировать даже при $4^{\circ}C$.

4. На этой стадии следует иметь подготовленную к работе кювету и все необходимое для спуска раствора на поверхность. Маленькая пластмассовая чашка Петри (например, чашка диаметром 50 мм для культуры тканей) хороша в качестве кюветы, а для наклонного спуска раствора на водную поверхность можно использовать предметные стекла для микроскопа. Стекла должны быть отмыты сначала кислотой, а затем раствором детергента, после чего их следует тщательно ополоснуть дистиллированной водой. Кюветы ополаскивают гипофазой, которая состоит из смеси 45 мл 0,01 М трис-HCl, 1,1 мМ ЭДТА, pH 8,5, и 5 мл 99%-ного формамида (Mallincrodt). Кювету наполняют гипофазой до образования выпуклого мениска.

5. Пользуясь чистым пинцетом, предметные стекла тщательно прополаскивают в растворе гипофазы и укрепляют их под углом $30-45^{\circ}$ у внутреннего края чашки.

6. Распыляют небольшое количество порошка талька тонкого помола на половину пути между местом нанесения раствора ДНК и нижним краем стекла. Тальк наносят с помощью пастеровской пипетки, один конец которой прикрыт бумажной тканью, а другой соединен с грушей. Можно также нанести тальк кисточкой из верблюжьей шерсти.

Порошок талька служит для определения границ монослоя во время растягивания пленки, к тому же он обеспечивает некоторое сжатие пленки, удерживая края монослоя.

7. Добавляют в 5-мл стакан разового использования 95 мкл раствора прошедшей отжиг ДНК и 5 мкл свежес-

приготовленного на дистиллированной воде раствора (2 мг/мл) цитохрома *c* (Sigma, тип II).

Раствор ДНК с цитохромом *c* набирают с помощью какого-либо механического наборного устройства в пипетку с надетым на нее 100-мкл пластмассовым наконечником (его кончик должен быть отрезан).

8. Раствор ДНК с цитохромом *c* медленно выливают на предметное стекло на высоте около 0,5 см над водной поверхностью. Между наконечником пипетки и гипофазой на стекле постоянно должен быть перешеек жидкости. Стараются не дышать над поверхностью и не двигать предметное стекло. Как только сформируется белковый монослой, тальк сразу же перемещается с предметного стекла к краям чашки.

Если образуются завихрения, часть талька по кругу возвращается обратно к стеклу, а пленка цитохрома занимает область, свободную от талька.

9. Через 1 мин после растягивания монослоя по поверхности берут пинцетом покрытую парлоидом сетку и осторожно опускают ее парлоидом вниз на монослой белка; после некоторой паузы поворачивают и поднимают сетку под углом 20—30°. В норме сетка должна быть покрыта большой плоской каплей. Таким способом готовят две — три сетки с монослоем из разных участков поверхности.

10. Окрашивают образец, погружая сетку в $5 \cdot 10^{-5}$ М уранилацетат на 30 с.

11. Опускают сетку в изопентан на 10 с, чтобы облегчить высушивание.

12. Одно- и двухцепочечные участки ДНК должны быть видны в электронном микроскопе без натенения, но натенение позволяет лучше их различать. Закрепляют сетки на предметном стекле при помощи липкой с обеих сторон ленты и затем напыляют их при вращении под углом около 7°, используя для этого 1,2-см отрезок платино-палладиевой (80 : 20) проволоки 23-го размера (Ted Pella, Inc.) в вольфрамовой корзине (E. F. Fullam, Inc.). Разрежение в камере испарителя напыляющего аппарата перед напылением должно быть меньше $6 \cdot 10^{-5}$ мм рт. ст.

13. Теперь сетки готовы к просмотру в электронном микроскопе. 20 разных гетеродуплексных молекул дают

статистически надежные картины для измерения одно- и двухцепочечных участков. В качестве маркеров удобно использовать одноцепочечную ДНК фага ϕX и двухцепочечную ДНК. Увеличение при электронной микроскопии можно откалибровать по стандартной выпускаемой промышленностью решетке (Ted Pella, Inc.).

Длину ДНК на фотографических негативах измеряют при помощи увеличительного степпа (электронные планиметры фирм Numonic или Hewlett-Packard) или навесных проекционных систем (фотоувеличитель). Иногда пользуются ручным курвиметром, но это более трудоемко.

*Рекомендации по определению гомологии ДНК
с помощью электронной микроскопии*

1. Необходимо соблюдать чистоту. Пристающие к поверхности вещества, такие, как детергенты, масляные пары и оставаемый пальцами жир, мешают формированию монослоя и равномерному распределению белка. Не следует допускать загрязнения этими веществами оборудования, посуды или растворов.

2. Трис, уранилацетат, Na_2 -ЭДТА и парлодий нужно хранить в эксикаторе. Все реактивы должны быть химически чистыми. Перечисленные ниже растворы следует стерилизовать фильтрованием: 1 М трис, 0,1 М Na_2 -ЭДТА, 1,8 М трис- HCl , 0,2 М трис, 0,1 М NaOH и 0,02 М Na_2 -ЭДТА. Для приготовления исходного концентрированного раствора уранилацетата делают $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор уранилацетата в 10 мл 0,05 н. HCl и стерилизуют его фильтрованием. Для окрашивания концентрированный раствор разводят в 100 раз 90%-ным этанолом. Концентрированный раствор хранят только 1 нед, а разведенный раствор для окрашивания — лишь в течение нескольких часов.

3. Формамид (HCONH_2) гидролизуетсся с образованием формиата аммония, который в свою очередь дает аммиак и муравьиную кислоту. Происходящие при этом изменения ионной силы в растворах верхней и нижней фаз могут приводить к неполному расправлению одноцепочечной ДНК. Аммиак может испаряться, приводя к быстрому снижению рН. Вследствие этого водные рас-

творы формамида следует использовать в первые 15 мин после смешивания. Формамид фирмы Mallincrodt с 99%-ным содержанием можно использовать непосредственно без очистки; реактивы худшего качества предварительно должны очищаться. Чистоту реактива можно определить измерением оптической плотности при 270 нм, которая должна быть $< 0,2$. Очистку формамида проводят перекристаллизацией следующим методом: оставляют формамид в запечатанной бутылки или колбе при 0°C (запечатывание предотвращает поглощение воды) до тех пор, пока $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ его не закристаллизуется; кристаллы отделяют фильтрованием в холодной комнате или центрифугированием при 0°C.

4. Растягивание монослоев проводят в пластмассовых чашках Петри диаметром 50 мм. Во время растягивания чашки фиксируют липкой лентой.

5. Предметные стекла моют и хранят в хромпике, а перед использованием тщательно промывают дистиллированной или бидистиллированной водой. После использования их ополаскивают водой и кладут опять в хромпик.

6. Для приготовления сеток, покрытых парлодием, растворяют высушенный в сушильном шкафу при 60°C парлодий (пироксилин, Mallincrodt) в изоамилацетате или амилацетате до концентрации 3,5%. Для лучшего растворения смесь перемешивают, но не встряхивают и затем добавляют в нее поглотители воды. Сетки покрывают парлодием следующим образом.

а) Помещают на подставку, лежащую на дне перекрытой воронки Бюхнера, решетку из стальной проволоки. Воронку наполняют бидистиллированной водой и укладывают сетки на эту решетку. Для обычной работы подходят медные сетки с размером ячейки 200 меш (E. F. Fullam, Inc.). Важно, чтобы все сетки были расположены одинаково: все либо матовой, либо блестящей стороной вверх.

б) Очищают водную поверхность, добавляя несколько капель раствора парлодия и удаляя бумагой образовавшуюся пленку, после того как она высохнет.

в) Получают пленку из одной капли раствора парлодия. Накрывают воронку оберточной бумагой Sarap и ждут около 3 мин, пока блестящая парлодиевая пленка не образует у краев воронки широкие складки. Медленно спускают воду, чтобы пленка опустилась на сетки. С задней стороны решетки, на которой лежат сетки, убирают избыток воды и кладут ее вместе с покрытыми парлодием сетками в сушильный шкаф с температурой 60°C на 45 мин. Если пленка приготовлена правильно, она кажется серебристой.

7. Приводим адреса некоторых поставщиков электронно-микроскопического оборудования и реактивов:

E. F. Fullam, Inc., P. O. Box 444, Schenectady, NY 12301 (518/785-5533)

Numonics, P. O. Box 444, North Wales, PA 19454 (215/643-7410)

Ted Pella, Inc., P. O. Box 510, Tustin, CA 92680 (714/557-9434)

15.4. ЛИТЕРАТУРА

1. Boyer H. W. Restriction and modification of DNA: enzyme substrates. Fed. Proc., **33**, 1125—1127 (1974).
2. Chakrabarty A. M. Plasmids in *Pseudomonas*. Annu. Rev. Genet., **10**, 7—30 (1976).
3. Clayton D. A., Davis R. W., Vinograd J. Homology and structural relationships between the dimeric and monomeric circular forms of mitochondrial DNA from human leukemic leukocytes. J. Mol. Biol., **47**, 137—153 (1970).
4. Clewell D. B., Helinski D. R. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular form. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **62**, 1159—1166 (1969).
5. Clowes R. C. Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol. Rev., **36**, 361—405 (1972).
6. Crosa J. H., Brenner D. J., Falkow S. Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. J. Bacteriol., **115**, 904—911 (1973).
7. Crosa J. H., Luttrupp L. K., Heffron F., Falkow S. Two replication initiation sites on R-plasmid DNA. Mol. Gen. Genet., **140**, 39—50 (1975).
8. Crosa J. H., Olarte J., Mata L. J., Luttrupp L. K., Penoranda M. E. Characterization of a R-plasmid associated with ampicillin resistance in *Shigella dysenteriae* type 1 isolated from epidemics. Antimicrob. Agents Chemother., **11**, 553—558 (1977).
9. Currier T. C., Nester E. W. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem., **76**, 431—441 (1976).
10. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid, **1**, 584—588 (1978).
11. Finkelstein M., Rownd R. H. A rapid method for extracting DNA from agarose gels. Plasmid, **1**, 557—562 (1978).
12. Grindley N. D. F., Humphreys G. O., Anderson E. S. Molecular studies of R-factor compatibility groups. J. Bacteriol., **115**, 387—398 (1973).
13. Querry P., LeBlanc D. J., Falkow F. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., **116**, 1064—1066 (1973).
14. Hansen J. B., Olsen R. H. Isolation of large bacterial plasmids and

- characterization of the P2 incompatibility group plasmids PMG1 and PMG5. *J. Bacteriol.*, **135**, 227—238 (1978).
15. *Helinski D. R.* Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R-factor. *Annu. Rev. Microbiol.*, **27**, 437—470 (1973).
 16. *Hirt B.* Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.*, **26**, 365—369 (1967).
 17. *Humphreys G. O., Willshaw G. A., Anderson E. S.* A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 457—463 (1975).
 18. *Kleinschmidt A. K.* Monolayer techniques in electron microscopy. *Methods Enzymol.*, **12B**, 361—377 (1978).
 19. *Kupersztoch Y. M., Helinski D. R.* A catenated DNA molecule as an intermediate in the replication of the resistance transfer factor R6K in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1451—1459 (1973).
 20. *Kupersztoch-Portnoy Y. M., Lovett M. A., Helinski D. R.* Strand and site specificity of the relaxation complex of the antibiotic resistance plasmid R6K. *Biochemistry*, **13**, 5484—5490 (1974).
 21. *Lederberg J.* Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol. Rev.*, **32**, 403—430 (1952).
 22. *Manis J. J., Whitfield H. J.* Physical characterization of a plasmid cointegrate containing an F' *his gnd* element and the *Salmonella typhimurium* LT2 cryptic plasmid. *J. Bacteriol.*, **129**, 1601—1606 (1977).
 23. *Myers J. A., Sanchez D., Elwell L. P., Falkow S.* A simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **127**, 1529—1537 (1976).
 24. *Palchaudhuri S.* Molecular characterization of hydrocarbon degradative plasmids in *Pseudomonas putida*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 518—525 (1977).
 25. *Radloff R., Bauer W., Vinograd J.* A dye buoyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1514—1522 (1967).
 26. *Sharp P. A., Hsu M. T., Ohtsubo E., Davidson N.* Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. I. Structure of R-prime factors. *J. Mol. Biol.*, **71**, 471—497 (1972).
 27. *Skurrey R. A., Nagaishi H., Clark J.* Molecular cloning of DNA from F sex factor of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 64—68 (1976).
 28. *Southern E. M.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503—517 (1975).
 29. *Thompson R., Hughes S. G., Broda P.* Plasmid identification using specific endonucleases. *Mol. Gen. Genet.*, **133**, 141—149 (1974).
 30. *Watson B., Currier T. C., Gordon M. P., Chilton M.-D., Nester E. W.* Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, **123**, 255—264 (1975).

Часть IV

МЕТАБОЛИЗМ

ВВЕДЕНИЕ

В. Вуд

Метаболическая активность бактериальных клеток представляет собой организованную и регулируемую последовательность ферментативных процессов синтеза и распада, ответственных за поддержание, рост, движение и репродукцию микроорганизмов. Эти функции осуществляются за счет источников энергии и других питательных веществ внутри- и внеклеточного происхождения. Метаболические системы, лежащие в основе указанных функций, изучают с помощью разнообразных биологических, физических, химических и ферментативных методов. Биологические методы, применяемые главным образом для изучения пищевых потребностей и генетики микроорганизмов, описаны в других разделах этого руководства.

В данном разделе рассматриваются физические, химические и ферментативные методы, которые используются при исследовании метаболизма бактерий. В последующих главах описаны физические методы и приборы, фракционирование и анализ химических компонентов, выделение и количественное определение ферментов, изучение катализируемых ими реакций, а также исследование проницаемости клеток и транспортных процессов. Все эти вопросы разработаны настолько хорошо, что вполне оправданно опубликование специальных книг, посвященных их методологии и применению. Однако в данном случае авторы ограничились описанием только самых надежных и простых методов, которые могут использовать для достаточно основательного изучения метаболизма бактерий даже начинающие исследователи.

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В. Вуд

Эта глава включает материал по основным физико-аналитическим методам и процедурам разделения: фотометрии, ионселективным электродам, хроматографии, измерению радиоактивности, гель-электрофорезу и манометрии. Их использование в бактериологии во многих случаях сыграло важную роль и стало почти характерной чертой этой области науки. В настоящем руководстве приводится общее описание как достоинств, так и слабых сторон методов, специальных методик, прописей, а также примеров их применения в исследованиях бактерий.

В этой главе особенно необходимо ограничиться описанием простых процедур, пригодных для лабораторных занятий или представляющих ценность на начальных этапах научных исследований, поскольку более глубокое изложение каждого вопроса можно найти в книгах, специально посвященных какому-то одному методу. Некоторые методы здесь вообще не рассматриваются или упоминаются лишь кратко; среди них тонкослойная хроматография, седиментационный анализ макромолекул и различные типы электрофореза. В то же время в этой главе приведена информация, мало известная бактериологам.

16.1. ФОТОМЕТРИЯ

В научных и практических исследованиях по бактериологии широко применяются самые разнообразные фотометрические методы, в том числе абсорбционная фотометрия, флуориметрия и нефелометрия, а также абсорбционная и эмиссионная фотометрия пламени и методы ядерного магнитного и электронного парамагнитного резонанса [1, 2]. Все эти методы позволяют

идентифицировать соединения, устанавливать их структуру, определять концентрации веществ и скорости реакций.

16.1.1. Абсорбционная фотометрия

С помощью спектрофотометров для измерения поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра определяют способность растворенных веществ поглощать свет при определенных длинах волн. График, на котором поглощение света отложено против длины волны (*спектр поглощения*), помогает идентифицировать соединения и дает информацию о структуре хромофоров. Количество света, поглощенного измеряемым веществом при той или иной длине волны, позволяет определять его концентрацию, а изменение поглощения во времени — скорости реакций.

Имеющийся в приборе монохроматор выделяет из всего спектра источника света излучение в узком диапазоне длин волн и направляет его через образец к фотометру, в котором количество поступающей энергии измеряется и выражается в виде отношения интенсивности пропущенного света (I_T) к интенсивности падающего света (I_0). Если I_0 принять за 100, то измеренная величина является *пропусканием*, выраженным в процентах ($\%T$). Значение $\%T$ связано с величиной молярной концентрации (C) поглощающего вещества в соответствии с законом Ламберта — Бэра:

$$-\lg \%T = \varepsilon \cdot l \cdot C = A^1),$$

где ε — молярный коэффициент поглощения образца при заданной длине волны, а l — длина пути света в сантиметрах. Поскольку ε и l — постоянные величины, C пропорциональна отрицательному логарифму $\%T$ или прямо пропорциональна поглощаемости (A)²⁾. Поэтому

¹⁾ В этой формуле допущена ошибка. На самом деле T выражается не в процентах, а в долях единицы. Поэтому $A = -\lg T$. Основной закон поглощения часто называют также законом Бугера—Ламберта—Бэра или просто законом Бэра. — *Прим. ред.*

²⁾ В отечественной литературе вместо термина «поглощаемость» (A) принят термин «оптическая плотность» (D), которым мы и будем здесь пользоваться. — *Прим. ред.*

более поздние модели спектрофотометров с линейной шкалой для A более приспособлены для точных измерений образцов со средними или большими значениями оптической плотности.

Факторы, влияющие на качественные характеристики

Качество лабораторных спектрофотометров определяется следующими факторами: монохроматичностью света, падающего на образец, интенсивностью и площадью светового пучка (числовая апертура), точностью калибровки по длинам волн, точностью калибровки фотометра, линейностью показаний фотометра, шумом, а также инерционностью и стабильностью нулевой линии. Повышение качества приборов достигается иногда в результате увеличения их размеров и стоимости. Однако при проведении биологических экспериментов предпочтительнее до предела использовать все возможности имеющегося в наличии простого прибора, а не уповать на приобретение спектрофотометра высокого класса.

Влияние спектральной ширины полосы

Спектральная чистота света, пропускаемого монохроматором при номинально указанной длине волны, или, иными словами, *естественная ширина полосы*, — это ее ширина в нанометрах, измеренная на половине высоты максимума энергии излучения (рис. 16.1, 1). Эта ширина полосы указана для каждого прибора, и ее трудно определить в лабораторных условиях без узкополосного (≈ 1 нм) интерференционного фильтра. У монохроматоров, у которых диспергирующим элементом служит решетка, ширина полосы достаточно постоянна в пределах данного диапазона длин волн, однако у призмных монохроматоров ширина полосы меняется с длиной волны. В обоих случаях ширина полосы зависит от ширины щели. Точность измерения оптической плотности при условии, что нет рассеянного света (см. ниже), зависит от отношения *спектральной ширины полосы* (характеристика прибора) к естественной ширине полосы, т. е. к ширине в нанометрах на половине высо-

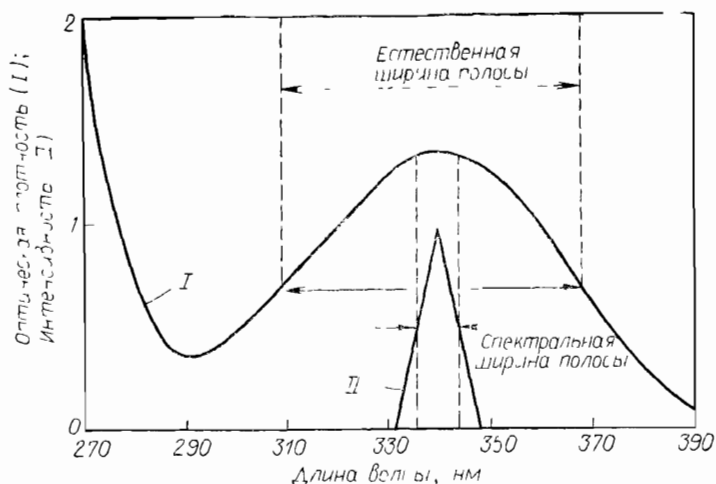


Рис. 16.1. I — график, показывающий естественную ширину полосы NADH; естественная ширина полосы равна 58 нм. II — схематический график ширины полосы спектра выходящего излучения спектрофотометра; спектральная ширина полосы равна 8 нм.

ты максимума поглощения образца (характеристика хромофора в растворе) (рис. 16.1, II). Так, с помощью недорогого спектрофотометра, имеющего при 340 нм спектральную ширину полосы 8 нм, можно измерить оптическую плотность образца с естественной шириной полосы 80 нм (величина отношения равна 0,1) с точностью 99,5% [4]. В случае хромофора с естественной шириной полосы 50 нм при спектральной ширине 8 нм достигается точность измерения 99%. Восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (NADH), соединение, наиболее часто анализируемое при 340 нм, имеет при этой длине волны естественную ширину полосы 58 нм. Отсюда ясно, что NADH можно измерить с помощью недорогого спектрофотометра с более чем 99%-ной точностью [4].

Влияние рассеянного света

Еще одно следствие широкополосности или низкой спектральной чистоты света — это повышение доли рассеянного света, т. е. излучения, отличающегося по длине

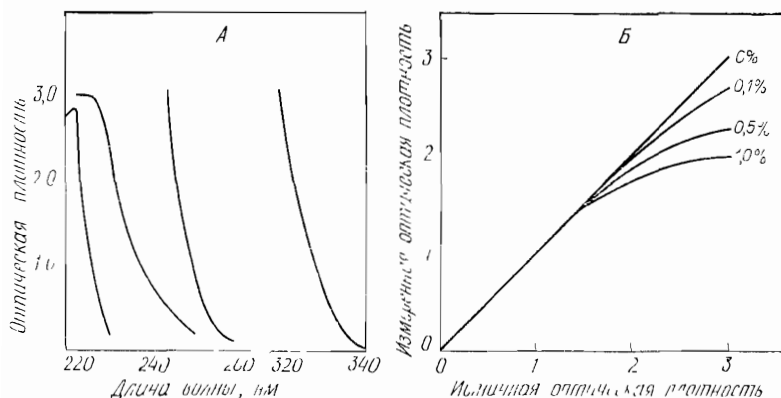


Рис. 16.2. А. Оптическая плотность растворителей (слева направо: 0,1 М бромид натрия, этиленхлоргидрин, дихлорэтан, ацетон), используемых для определения примеси рассеянного монохроматором света. Б. Влияние различного процентного содержания рассеянного света на выполнимость закона Ламберта—Бэра для хромофора.

волны от указанного на шкале и выходящего за пределы спектральной ширины пропускания прибора. Поскольку спектральная ширина пропускания призмённых монохроматоров зависит как от ширины щелей, так и от длины волны, от них зависит также и примесь рассеянного света. Рассеянный свет возникает из-за неполного удаления нежелательных длин волн в результате несовершенства конструкции или загрязнения оптики. Примесь рассеянного света в выходящем световом пучке искажает линейную зависимость оптической плотности от концентрации хромофора, т. е. нарушает выполнимость закона Ламберта—Бэра. Исследователь должен определить диапазон длин волн, в котором линейная зависимость сохраняется.

Так как примесь рассеянного света возрастает при уменьшении длины волны, простой и надёжный способ определения рассеянного света в приборе заключается в использовании в качестве граничных светофильтров (пропускание резко уменьшается в коротковолновой области) обычных растворителей [5]. На рис. 16.2, А показана зависимость оптической плотности от длин волн для нескольких растворителей. Резкое отличие оптиче-

ской плотности, измеряемой обычными лабораторными спектрофотометрами, от ее номинальных значений указывает на то, что рассеянный свет преобладает над монохроматическим. Поэтому невозможно измерять оптическую плотность растворов в области спектра, где примесь рассеянного света становится значительной. Влияние процентного содержания рассеянного света на выполнимость закона Ламберта — Бэра показано на рис. 16.2, Б [4]. Процентное содержание рассеянного света представляет собой пропускание, выраженное в процентах, при длине волны, где граничный светофильтр непрозрачен.

Новейшие широко используемые спектрофотометры позволяют производить точные измерения оптической плотности при ширине полосы 0,2—0,3 нм (2,0—3,0 Å), но эта возможность может быть утрачена в результате загрязнения оптики, флуоресценции образцов или вследствие проникновения постороннего света.

Точность и линейность фотометрических измерений

В некоторых спектрофотометрах невозможно регулировать калибровку фотометрического блока, и линейность показаний лишь предполагается. Поэтому, по крайней мере для одного спектрофотометра, нужно провести калибровку с помощью прилагаемых стандартов с известной величиной оптической плотности. В любом случае следует определить точность и линейность измерения оптической плотности и, если необходимо, составить таблицу погрешностей. В тех приборах, которые позволяют проводить калибровку шкалы оптической плотности, для ее настройки можно использовать набор нейтральных стандартных светофильтров с известными значениями оптической плотности при определенных длинах волн. Если показания фотометра линейно зависят от оптической плотности светофильтров, то прибор считается откалиброванным. Национальное бюро стандартов и некоторые компании поставляют стандартные стеклянные светофильтры или дают инструкции по приготовлению жидкостных стандартов оптической плотности [3, 7].

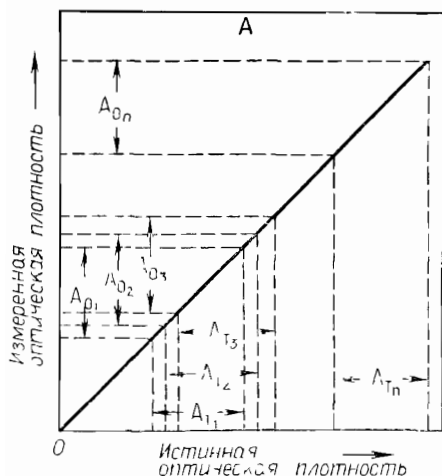
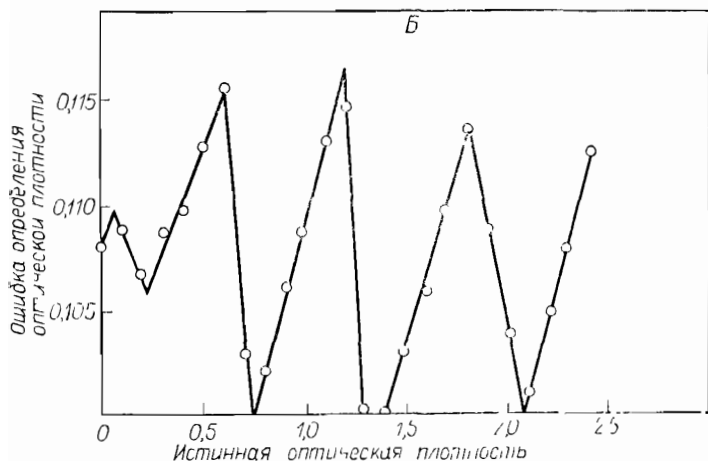


Рис. 16.3. А. Зависимость измеренной (A_0) от истинной (A_T) оптической плотности для спектрофотометра. Б. Зависимость ошибки определения оптической плотности ($\Delta A_0/\Delta A_T$) от истинных значений оптической плотности.



Наличие линейности при определенной длине волны можно проверить с помощью одного из вариантов описанной ниже методики, используя либо стандарт с известной оптической плотностью, составляющей приблизительно $0,4 \text{ A}_T$, либо нейтральный светофильтр, либо раствор, имеющий примерно такую же оптическую плотность (A_N). Для этого нужно: 1) установить свето-

фильтр в держателе таким образом, чтобы в пучок света можно было поместить либо образец сравнения (воздух или воду), либо фильтр, и выставить нуль фотометра на образце сравнения; 2) поместить светофильтр на пути света и определить оптическую плотность (A_{0_1}); 3) вновь поместить в пучок света образец сравнения (воздух или воду) и уменьшить щель так, чтобы образец сравнения дал какое-либо произвольное значение оптической плотности (A_x), например 0,1; 4) снова установить светофильтр и измерить оптическую плотность (A_{0_2}). Истинная оптическая плотность при таком измерении равна A_T (или A_N) + A_x . Наблюдаемая оптическая плотность равна $A_{0_1} + A_x$. Этот процесс можно повторять несколько раз, уменьшая щель, когда в световом пучке находится образец сравнения, для получения величины оптической плотности A_y и определяя затем оптическую плотность светофильтра A_{0_2} . В результате получают ряд истинных и наблюдаемых значений оптической плотности, постепенно возрастающих от A_T через определенные интервалы на шкале оптической плотности. При более низком значении A_T число точек, необходимое для определения линейности, следует увеличить. На рис. 16.3, А изображен график зависимости наблюдаемых значений оптической плотности от истинных для данного прибора. Если прирост значений на графике постоянен, то показания фотометра линейны. На рис. 16.3, Б показана зависимость ошибки ($A_0 - A_T$)¹⁾ наблюдаемых значений оптической плотности (A_0) от истинных значений поглощения. Этот график особенно наглядно показывает отклонение от линейности и величину ошибки.

Влияние ширины щели

Для призматических монохроматоров, работающих при определенной выставленной щели, характерна сильно выраженная нелинейная зависимость спектральной ширины полосы от длины волны. В руководствах по эксплуатации спектрофотометров приводятся графики та-

¹⁾ Вместо ($A_0 - A_T$) следует читать ($\Delta A_0 - \Delta A_T$). — Прим. ред.

кой зависимости; один из них для примера приведен на рис. 16.4. Таким образом, чтобы провести измерения при постоянной спектральной ширине полосы с помощью призмной оптики, необходимо установить ширину щели в соответствии с графиком. Для точного определения концентрации растворенного вещества следует установить такую же ширину щели, как и при определении коэффициента поглощения. С другой стороны, вместе с результатами определения коэффициента поглощения необходимо указывать и спектральную ширину полосы. При работе с призмными приборами приводят как ширину щели, так и график зависимости ширины полосы от длины волны для данного прибора.

Аналогичным образом спектры следует регистрировать при постоянной ширине полосы, а не при постоянной ширине щели. Величины оптической плотности при определенной длине волны или спектры поглощения, полученные при двух различных значениях ширины щели, редко бывают идентичными. Погрешность увеличивается при наличии острых максимумов и может быть незначительной в случае широких максимумов. Поэтому целесообразно использовать минимальную ширину щели.

Кроме того, ширина щели зависит от чувствительности фотометра, спектральных характеристик фотодетектора, а также от источника освещения. Еще более важно то, что на ширину щели сильно влияют мощность лампы, чистота оптических поверхностей и качество фокусировки источника. Считается, что у средних спектрофотометров нулевая линия должна устанавливаться при 210 нм или при меньшей длине волны при ширине ще-

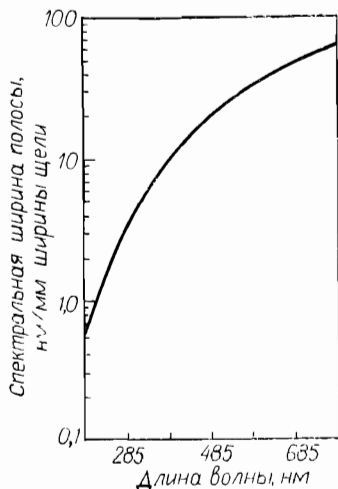


Рис. 16.4 Влияние длины волны на спектральную ширину полосы призмного монохроматора на примере спектрофотометра Gilford (модель 2400).

ли 2 мм. Если этого нельзя сделать, то следует проверить перечисленные выше факторы.

Сравнение однолучевых и двухлучевых спектрофотометров

Двухлучевые спектрофотометры сконструированы таким образом, что благодаря наличию в них двух пучков света они позволяют осуществлять одновременное или параллельное сравнение интенсивностей I_0 и I_T ; в однолучевых приборах эти два измерения проводят последовательно. В двухлучевых спектрофотометрах пучок света разделяется так, что одна его часть проходит через раствор, используемый для установки прибора при $I_0 = \%T = 100$ или $A_0 = 0$, а другая — через образец для измерения $\%T$ или A_1 . Для получения достоверных результатов необходимо, чтобы параллельные оптические системы и соответствующие электронные устройства работали идентично. Это осуществляется с помощью особых приспособлений, имеющихся сейчас во многих современных приборах. В однолучевых спектрофотометрах для достижения той же цели вначале устанавливают $\%T = 100$ или $A = 0$ для образца сравнения, а затем определяют $\%T$ или A , помещая в пучок света измеряемый образец.

Широко распространено мнение о том, что двухлучевые спектрофотометры лучше, чем однолучевые. Часто считают, что однолучевые приборы недостаточно точны. Это верно только в особых случаях. Двухлучевой спектрофотометр имеет преимущество, когда необходимо быстро снять спектр, а также когда источник света однолучевого прибора нестабилен или наблюдается быстрый дрейф нуля. Двухлучевые приборы очень удобны для прямой регистрации дифференциальных спектров. Однако нет никакой необходимости использовать их для отдельных измерений оптической плотности, например при колориметрических определениях и других обычных спектрофотометрических измерениях.

Регистрация спектров

Спектры удобнее всего регистрировать с помощью двухлучевого спектрофотометра, снабженного самописцем. В одну кювету помещают образец сравнения (ка-

кой-нибудь буферный раствор), а во вторую — измеряемый образец в том же растворителе. Чтобы повысить разрешение, устанавливают как можно более узкие щели и осуществляют сканирование при низкой скорости. При проведении важных экспериментов следует убедиться, что концентрация хромофора соответствует области линейных показаний прибора, что флуоресценция не мешает измерениям при высоких концентрациях хромофора (это проверяется с помощью флуориметра) и что прибор откалиброван по длинам волн.

Для определения спектра с помощью однолучевого спектрофотометра вручную устанавливают необходимые значения длин волн. Используя образец сравнения, прибор ставят на 0 при каждой длине волны и определяют оптическую плотность образца. Затем строят график, откладывая по оси x длину волны (в нанометрах), а по оси y значения A . Такой способ определения спектров, хотя и трудоемок, однако вполне приемлем для многих целей.

Определение концентрации веществ в растворах

С помощью правильно откалиброванного спектрофотометра концентрацию растворенного вещества можно определить в стандартных кюветах с длиной оптического пути 1 см непосредственно по оптической плотности при определенной длине волны, если известен молярный коэффициент поглощения (ϵ) этого вещества при данной длине волны: A/ϵ (моль/л или ммоль/мл). Однако ни высококачественный спектрофотометр, ни определение коэффициента поглощения не нужны в тех случаях, когда имеется чистое вещество, с помощью которого можно откалибровать даже колориметр, снабженный фильтрами. При этом получают стандартный график зависимости оптической плотности от концентрации для серии стандартных растворов, концентрацию вещества в которых можно измерить непосредственно или определить по цветной реакции. Графики показывают линейный диапазон и ошибки отдельных измерений. Можно применять стандартную статистическую обработку данных, т. е. определение воспроизводимости измерений, построение прямолинейных графиков методом наименьших квадратов, определение стандартного отклонения от

среднего значения и стандартной ошибки. Хотя линейность — это весьма желательное условие, можно использовать также и нелинейную хорошо воспроизводимую калибровочную кривую, паходя величины прямо из графика.

Определение концентрации частиц [6]

Фотометрическое определение концентрации частиц в суспензии зависит от степени ослабления светового пучка в результате рассеяния света. В предназначенном для такого определения *нефелометре* имеется высокочувствительный фотометр с фотодетектором, расположенным под углом $90-160^\circ$ к падающему световому пучку. Фотометрический сигнал не подчиняется закону Ламберта — Бэра, тем не менее при очень низких концентрациях частиц, которые можно измерить с помощью нефелометра, но не фотометра, измеряющего пропускание, сигнал бывает почти линейным. Для измерения более высоких концентраций частиц можно также использовать спектрофотометры и колориметры, но такой метод основан на определении ослабления падающего светового пучка. В приборах обоих типов получают калибровочную кривую зависимости сигнала от концентрации бактериальных клеток (см. разд. 11.4).

Определение скоростей реакций

Если реагирующее вещество или продукт реакции представляет собой хромофор, скорость его потребления или образования можно определить, измеряя оптическую плотность при фиксированной длине волны через те или иные промежутки времени или следя за изменением поглощения во времени с помощью самописца. Скорость реакции можно определить по наклону кривой зависимости оптической плотности от времени. Для этой цели разработаны специальные спектрофотометры и приставки к стандартным спектрофотометрам. Некоторые из них, специально предназначенные для определения скоростей реакций, катализируемых ферментами, регистрируют величины оптической плотности непосредственно на бумаге самописца, что дает возможность следить одновременно за протеканием нескольких реакций.

16.1.2. Флуориметрия

Флуоресценция — это испускание света флуорофором, который поглощает свет при меньшей длине волны. Поскольку измерение основано на сравнении энергии излучения в измеряемой пробе с очень низким уровнем излучения в контрольном образце, отношение сигнала к шуму очень высоко и, следовательно, флуориметрические измерения более чувствительны, чем абсорбционные. Например, определение NADH, основанное на флуоресценции, приблизительно в 100 раз чувствительнее, чем спектрофотометрический метод. Интенсивность флуоресценции зависит как от концентрации флуорофора, так и (в отличие от поглощения) от интенсивности возбуждающего излучения. Поскольку возбуждение и излучение флуоресценции возникают при различных длинах волн, прибор должен быть устроен так, чтобы энергия возбуждения не доходила до фотодетектора. Это обычно достигается путем помещения детектора под углом 90° к световому пучку, возбуждающему излучение. Светорассеяние как в растворе, так и от поверхности может создавать большие трудности, но его можно свести к минимуму с помощью граничных фильтров с «крутым» фронтом, пропускающих энергию флуоресценции, но задерживающих энергию возбуждения.

Поскольку интенсивность флуоресценции зависит от интенсивности возбуждающего света, первостепенное значение имеют характеристики излучения лампы и стабильность ее работы. В некоторых приборах интенсивность возбуждающего света регулируется с помощью второго фотодетектора, при этом определяется отношение интенсивности флуоресценции к интенсивности возбуждающего света.

При низких интенсивностях флуоресцентного излучения выходное напряжение фотодетектора почти линейно зависит от интенсивности, следовательно, концентрация флуорофора пропорциональна эквиваленту пропускания¹⁾, а не оптической плотности, как при абсорбционной фотометрии. Концентрацию флуорофора можно опреде-

¹⁾ Интенсивность флуоресценции пропорциональна поглощению образца $(1-T)$, а не пропусканию (T) — *Прим. ред*

лить, измеряя относительную флуоресценцию. Определение заключается в основном в приготовлении контрольного растворителя и набора стандартных растворов, построении стандартной кривой и сравнении с неизвестными образцами. Поскольку чувствительность этого метода выше, вероятность влияния артефактов на результаты измерения больше, чем при абсорбционной фотометрии.

Нестабильность прибора

Необходимо проверять или предотвращать флуктуации возбуждающего света, возникающие из-за нестабильности лампы. Могут оказаться необходимыми частые повторные измерения чистого растворителя и стандартов.

Поглощение растворов

Высокая оптическая плотность растворов приводит к ошибкам двух типов: 1) реабсорбции энергии флуоресценции, заметно снижающей выход флуоресценции, и 2) неодинаковой интенсивности на передней излучающей поверхности в приборах, в которых регистрация производится под прямым углом. Это происходит в результате изменений интенсивности возбуждающего света, обусловленных высокой оптической плотностью измеряемого раствора при длине волны возбуждения. Поэтому оптическая плотность не должна превышать 0,2 и независимые измерения оптической плотности стандартных растворов и исследуемых образцов следует проводить при длинах волн возбуждения и излучения.

Флуоресценция примесей

Нижний предел чувствительности определяется флуоресценцией фона, которая снижается до минимума при использовании чистых реактивов. Кроме того, ошибки могут возникать из-за неодинакового загрязнения образцов и стеклянной посуды различными флуоресцирующими материалами, в том числе резиной, жирами, отпечатками пальцев и экстрактами из фильтровальной бумаги или диализной трубки. Мутность также увеличивает вероятность ошибки из-за рассеяния света, измеряемого как флуоресценция. Таким образом, стеклянную

посуду, в которой проводятся измерения и хранятся растворы, необходимо содержать в абсолютной чистоте. Многие из упомянутых выше эффектов можно свести к минимуму, применяя защитные фильтры перед фотомножителями.

Порча образцов и другие артефакты

Образцы могут портиться до или во время измерения. Довольно часто происходит фотохимическое разложение исследуемых соединений и их адсорбция на стеклянных поверхностях, что особенно касается макромокул. Первое из этих двух явлений может проявляться в виде ослабления флуоресценции с течением времени, а о наличии второго свидетельствует явное запаздывание изменения флуоресценции при увеличении концентрации образца или флуорофора.

Влияние температуры

Поскольку явления, связанные с флуоресценцией, зависят от температуры, все измерения следует проводить при постоянной температуре, предпочтительно в термостатируемой кювете.

16.2. ИОНСЕЛЕКТИВНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ

Уравнение Нернста

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox.}]}{[\text{Red.}]}$$

можно применять при измерении концентрации (активности) или отношения концентраций некоторых молекул или ионов. E — измеряемый потенциал, E_0 — стандартный потенциал электрода, $R = 8,314$ Дж/(моль·К), T — абсолютная температура, n — число электронов, $F = 96\,500$ Кл/(г-экв.), а $[\text{Ox.}]$ и $[\text{Red.}]$ — концентрации соответственно окисленных и восстановленных форм вещества.

Это фундаментальное уравнение электрохимии дает возможность определять ряд биологически важных ионов, например водорода, кислорода, аммония, хлора и многих других веществ. Использование данного уравнения при разработке прибора предполагает наличие в нем: 1) измерительного электрода, способного улавли-

вать потенциал, создаваемый окислительно-восстановительной парой, 2) стандартного полуэлемента с известным потенциалом и 3) электрометра или потенциометра, измеряющего напряжение между двумя полуэлементами. Решение уравнения Нернста для измеряющего полуэлемента вытекает из отношения

$$E \text{ (измеряющий полуэлемент)} = E + E_0.$$

Возможность определять тот или иной ион зависит от конструкции измеряющего электрода. Например, стеклянный электрод создает потенциал, пропорциональный концентрации ионов водорода, а некоторые ион-селективные электроды создают потенциалы для специфических ионов, так как мембрана или твердый материал, изолирующий металлический электрод от среды, является ионселективным. Существует много других подходов к определению концентрации различных ионов, основанных на свойствах электродов. Например, измерение кислорода с помощью электрода представляет собой один из видов полярографии, поскольку для ионизации кислорода необходимо поляризующее напряжение.

16.2.1. Электрод для измерения ионов водорода

Стеклянный электрод является практически единственным средством измерения активности водородных ионов. Тонкая мембрана из специального стекла отделяет хлорсеребряный полуэлемент от измеряемого раствора [11]. Электрический потенциал стеклянного электрода изменяется линейно в зависимости от рН в широком диапазоне значений рН — от 1 до 11. В области рН 11 и выше линейность показаний наблюдается только в том случае, если применяется специальное устойчивое к щелочи стекло. В качестве электрода сравнения используют стандартный каломельный (Hg_2Cl_2) полуэлемент, соединенный с измеряемым раствором с помощью солевого мостика (KCl). Оба электрода — стеклянный и стандартный — погружают в раствор образца или объединяют их в один комбинированный электрод, который можно вводить в длинные пробирки или приспособить для измерения очень малых объемов образцов.

Кроме статического определения рН образцов рН-метр или его автоматический вариант (рН-стат) позволяет следить за ходом реакций, в которых участвует или потребляется ион водорода. В этом случае для поддержания постоянного рН добавляют щелочь или кислоту; кривая потребления кислоты или щелочи, отложенного против значений времени, отражает развитие реакции. Ферментативное или химическое окисление глюкозы или глюкозо-6-фосфата, фосфорилирование субстратов при участии аденозинтрифосфатов и соответствующих киназ, а также гидролиз белков протеазами — все это примеры реакций, которые можно проследить с помощью стеклянного электрода.

Калибровка рН-метра

Прибор следует откалибровать с помощью буферных растворов с известными значениями рН. Для этой цели часто применяют готовые жидкие или твердые буферы с указанными на упаковках величинами рН, однако такой дорогостоящий и отнюдь не лучший способ калибровки использовать вовсе не обязательно. В табл. 16.1 приведены некоторые стандартные буферы [10], имеющие надежные значения рН. Если электрод дает линейные показания, то для калибровки прибора в пределах нужного диапазона рН можно использовать один стандартный буфер. Однако поведение электрода редко бывает идеальным, поэтому целесообразно использовать два стандартных буфера (например, с рН 4,00 и 6,88), установив тем самым соответствующий диапазон рН измеряемых растворов.

Таблица 16.1. Значения рН стандартных буферов при 20 °С [3]

рН	Буфер	рН	Буфер
1,10	0,1 М НСl	6,88	0,025 М KH_2PO_4 + + 0,025 М Na_2HPO_4
2,16	0,01 М тетраоксалат калия	9,22	0,01 М бора
4,00	0,05 М фталат калия	10,02	0,025 М NaHCO_3 + + 0,025 М Na_2CO_3

Некоторые трудности

Основные трудности, возникающие при измерении рН, обусловлены нелинейностью показаний в щелочной области, поглощением CO_2 нейтральными и щелочными пробами и стандартными растворами, а также постепенным испарением стандартных растворов. Большинство проблем, связанных с неудовлетворительной работой прибора, объясняется плохим содержанием электродов. Для точного и воспроизводимого измерения рН с помощью стеклянного электрода необходимо, чтобы на нем присутствовал уравновешенный слой геля. Фирмы-изготовители рекомендуют новый или уже промытый электрод выдерживать в течение нескольких дней в воде или сначала в буферном растворе, а затем в воде для образования на нем слоя геля; рекомендуется также между измерениями помещать электроды в дистиллированную воду. После использования электроды промывают и вытирают для удаления прилипших материалов.

К сожалению, недостаточная очистка электродов и их хранение в воде приводят к загрязнению стеклянной поверхности. Липиды и белки, прилипшие к стеклу, обуславливают нелинейные показания электрода и замедленную ответную реакцию прибора. Кроме того, на электроде может происходить рост бактерий, что также вызывает загрязнение стеклянной поверхности электрода и закупорку асбестовых волокон, служащих солевым мостиком между стандартным электродом и измеряемым раствором. В каломельном электроде следует поддерживать достаточно высокий уровень раствора KCl ; во время измерений пробку необходимо убирать, для того чтобы раствор KCl , вытекающий через асбестовое волокно, предотвращал его загрязнение примесями.

Если стеклянный электрод загрязнен, естественно возникает желание заменить его новым. Однако старый электрод можно хорошо очистить, помещая его несколько раз попеременно в 0,1 н. растворы HCl и NaOH при 50°C . Затем электрод вымачивают в воде, чтобы восстановить нарушенный слой геля. В трудных случаях рекомендуется погружать электроды сначала на несколько секунд в 10%-ный раствор HF , а затем в 5 н. HCl , после чего их вымачивают в дистиллированной воде.

Влияние солей

Измерение рН при высокой ионной силе измеряемого раствора приводит к ошибкам, достигающим 0,5 единицы рН. С этой проблемой часто сталкиваются при приготовлении высокомолярных растворов сульфата аммония, имеющих нейтральный или щелочной рН. Обычно перед измерением рН таких растворов их разбавляют в соотношении 1 : 20. Разбавление растворов полностью диссоциированных солей мало влияет на рН, так как соотношение ионов остается почти постоянным. При определенных обстоятельствах степень влияния солей проверяют с помощью стандартов, приготовленных с использованием исследуемых растворов солей.

16.2.2. Другие ионселективные электроды

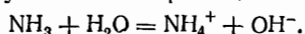
Существуют ионселективные электроды, предназначенные для электрометрического определения различных ионов и газов [8]. Большинство таких электродов находит применение в промышленных процессах, однако некоторые из них позволяют определять биологически важные ионы с достаточно высокой чувствительностью и избирательностью, чтобы их можно было использовать в бактериологических исследованиях. Ионселективные мембранные датчики делятся на четыре типа: стеклянные, твердые (или осадочные), газочувствительные и жидкостные (табл. 16.2). Ответная реакция электрода — это в широком смысле результат ионообменного процесса, причем возникающие потенциалы подчиняют-

Таблица 16.2. Некоторые ионселективные электроды, применяемые в бактериологии [8]

Стеклянные	Твердые	Газочувствительные	Жидкостные мембранные
H^+ , одновалентные катионы	Галоиды, S^- , SO_4^{2-}	CO_2 , NH_3 , SO_2 , NO_2 , H_2S , HCN	Br^- , I^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{2-} , органические вещества

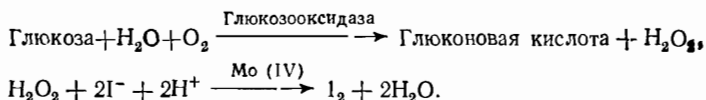
ся уравнению Нернста или одной из его более развернутых форм.

В аммиачном электроде имеется газопроницаемая мембрана [14], сквозь которую диффундирует аммиак, вступающий в реакцию с заполняющим раствором:



Концентрацию гидроксида в заполняющем растворе определяют затем с помощью электрода сравнения. Описываемый электрод специфичен по отношению к аммиаку; он позволяет определять также и ионы аммония после добавления к раствору NaOH до pH 11. Определению мешают только летучие амины. Использование электрода фирмы Orion Co. даст возможность определять аммиак в концентрациях от 17 мкг до 17 мг на 1 мл с точностью 2% или выше. Нитраты и нитриты также можно измерить после их восстановления, а азот, определяемый по Кьельдалю, — после сжигания пробы и добавления к ней NaOH (разд. 20.2.7). Для измерения азота мочевины необходимо иметь модифицированный аммиачный электрод, в котором вторая мембрана окружает раствор, содержащий уреазу. Согласно другому методу, образцы предварительно обрабатывают уреазой и проводят измерение с помощью обычного аммиачного электрода [14].

Ионселективные электроды можно приспособить для измерения активности ферментов и концентраций соединений, служащих субстратами для некоторых ферментов [15]. Например, кристаллический мембранный $\text{Hg}_2\text{S}/\text{HgI}$ -электрод, предназначенный для прослеживания за иодид-ионом, можно использовать и для определения глюкозооксидазы и глюкозы, согласно уравнениям



Модифицированный проточный иодид-чувствительный электрод позволяет при наличии автоанализатора исследовать до 70 проб в час. Если имеется избыток глюкозооксидазы и недостаток глюкозы, потенциометрическая реакция дает возможность определить содержа-

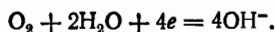
ние глюкозы в пробе. При избытке глюкозы и недостатке глюкозооксидазы скорость изменения потенциала можно использовать для измерения количества фермента.

Поскольку нет никакой системы для абсолютной калибровки проб (исключение составляет водородный электрод для измерения pH), с этой целью обычно используют разбавления стандартных маточных растворов, приготовленных из полностью диссоциирующих солей [16].

Что касается чувствительности измерений, то их можно проводить в диапазоне от 10^{-5} — 10^{-6} М до 1 М для выбранного иона. Датчик редко бывает высокоспецифическим в отношении какого-то одного иона. В действительности на результаты измерений часто влияют другие ионы. Например, 10% ответной реакции, которую дает кальциевый электрод, приходится на эквивалентные количества Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} , присутствующих в концентрации 10^{-5} — 10^{-6} М. Хлоридные электроды реагируют таким же образом на иодид- и бромид-ионы, т. е. при их концентрации 10^{-5} — 10^{-6} М они дают 10% всего отклика электрода. С другой стороны, K^+ -электрод совершенно нечувствителен к Na^+ , Li^+ , Cs^+ и H^+ . Степень чувствительности и избирательности измерений зависит от конкретного электрода. За подробной информацией по этому вопросу следует обращаться к инструкциям фирм-изготовителей.

16.2.3. Полярографический метод определения кислорода [12]

Взаимодействие кислорода с платиновым электродом при потенциале от $-0,5$ до $-0,8$ В описывается уравнением



Это уравнение показывает, что данный процесс сопровождается образованием потока электронов, т. е. возникновением тока в направлении к электроду. Ток, проходящий через резистор, на выходе из него создает напряжение. «Потенциал» такого полуэлемента при использовании его в сочетании со стандартным Hg_2Cl_2 -по-

луэлементом или с хлорсеребряным электродом можно измерить, если эти два полуэлемента соединить солевым мостиком. Кроме того, силу тока можно определить с помощью гальванометра. Измерение напряжения проводят после его усиления. Обе эти процедуры не требуют применения электрода сравнения.

Платиновый электрод может быть стационарным, вращающимся или вибрирующим (для сведения к минимуму диффузионных градиентов). Однако такие электроды обычно легко загрязняются при их применении для анализа биологических образцов. Эта проблема не возникает при использовании кислородного электрода Кларка [13], представляющего собой платиновый электрод, покрытый газопроницаемой мембраной. С помощью платинового электрода измеряют число, присутствующих на его поверхности молекул кислорода, главным образом на основе теории соударений. В электроде же Кларка время ответа пропорционально скорости диффузии кислорода через мембрану. В такой системе трансмембранный градиент концентрации кислорода возникает из-за того, что на поверхности электрода концентрация кислорода вследствие его потребления равна нулю. К счастью, скорость диффузии кислорода линейно зависит от его концентрации или парциального давления. Выход тока зависит также от площади платинового катода.

Кривая зависимости силы тока от поляризующего напряжения в диапазоне от $-0,5$ до $-0,8$ В изменяется пропорционально или почти пропорционально концентрации кислорода. Поэтому поляризующее напряжение должно соответствовать середине этого участка кривой. Подобная зависимость силы тока от поляризующего напряжения является главной характеристикой кислородного электрода.

Влияние температуры

Ток датчика весьма чувствителен к температуре, так как проницаемость материала мембраны имеет высокий температурный коэффициент (около 3—5% на 1°C). Кроме того, как хорошо известно, растворимость кислорода также зависит от температуры. Поэтому при рабо-

те с кислородным электродом необходим строгий контроль температуры и тщательное уравнивание измеряемых растворов при заданной температуре.

Калибровка и расчеты

Калибровка прибора основана на том, что кислород обладает определенной растворимостью в данных условиях. Для измерения нулевой концентрации кислорода к контрольному раствору добавляют дитионит натрия. Чтобы установить шкалу прибора на 100% ,используют какой-либо раствор, насыщенный кислородом. Концентрацию кислорода рассчитывают по коэффициенту распределения Бунзена, который можно найти в справочниках «International Critical Tables» или «Handbook of Chemistry and Physics». Затем определяют содержание кислорода в растворах, используемых в качестве рабочих стандартов. В большинстве случаев не требуются данные об истинной концентрации кислорода в стандартных растворах; для установки прибора необходимо лишь, чтобы показания концентрации кислорода были воспроизводимыми, так как измерения должны выявить разницу между экспериментальными образцами. Например, если насыщенный воздухом раствор Рингера содержит 5 мкл O_2 /мл, то 3 мл раствора, имеющего, согласно показаниям прибора, 92% насыщения, содержат 13,8 мкл O_2 ($3 \times 5,0 \times 0,92$). Скорость потребления или выделения кислорода либо подсчитывают исходя из двух измерений, проведенных в разное время, либо определяют по наклону кривых, построенных на основе многократных измерений и отражающих зависимость сигнала (в процентах полной шкалы) от времени. Так, если прибор показывает 92 и 70% при 0 и 5 мин соответственно, то расчеты производят следующим образом:

$$92 - 70 = 22\% \text{ потребленного } O_2 \text{ за 5 мин,}$$

$$5,0 \cdot 3 = 15 \text{ мкл } O_2 \cdot 0,22 = 3,3 \text{ мкл/5 мин (скорость реакции).}$$

К сожалению, не бывает так, чтобы изучаемые реакционные смеси имели тот же состав, что и проба, принятая при измерении за стандартную, поэтому в расчетах неизбежна некоторая ошибка. Однако эту ошибку можно свести до минимума, поддерживая низкую об-

шую концентрацию растворенных веществ. Если необходимы растворы с более высокой концентрацией кислорода, можно создать повышенное парциальное давление путем насыщения стандартных и рабочих растворов кислородом или кислородно-азотной смесью.

На содержание кислорода в стандартных растворах и реактивах влияют температура и атмосферное давление. Колебания барометрического давления редко изменяют концентрацию кислорода более чем на +3%. Барометрическая поправка к коэффициенту Бунзена рассчитывается следующим образом:

$$\frac{\text{Наблюдаемое барометрическое давление}}{760} \cdot \text{Растворимость при 760 мм}$$

Hg ($\approx 101,3$ кПа).

Проведение полярнографических измерений с помощью кислородного электрода

В начале эксперимента датчик следует проверить по четырем показателям: 1) наличию плато на кривой зависимости силы тока от поляризующего напряжения, 2) времени ответной реакции на ступенчатое изменение поляризующего напряжения 3) шуму и 4) дрейфу нулевой линии. Отсутствие горизонтального плато свидетельствует о загрязненности электрода, однако во многих случаях некоторый наклон данного участка кривой вполне допустим. Время ответной реакции на ступенчатое изменение поляризующего напряжения должно быть равно 1—1,5 мин. Шум может возникать вследствие плохих соединений и заземления, повреждения мембраны (образование складок, отверстий, кристаллов KCl или высыхание) или из-за неплотного контакта кислородного электрода с серебряным электродом; в последнем случае рекомендуется промывание системы аммиаком.

Дрейф нулевой линии правильно работающего датчика должен составлять менее 2% в час. Дрейф может быть вызван атмосферными изменениями или загрязнением датчика органическим материалом. Следовательно, правильный уход за датчиком и его чистота имеют важное значение. В одной из работ сообщалось о получении

воспроизводимых результатов при промывании датчика и резервуара реактивами, использовавшимися при анализе.

Сборка мембраны электрода

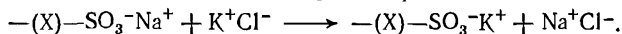
Важное значение при работе с электродом Кларка имеет прикрепление мембраны. Фирмы-изготовители вместе с прибором поставляют инструкции по его эксплуатации и запасные мембраны. При сборке мембраны следует обратить внимание на то, чтобы она ровно облегла датчик, чтобы везде создавалась полная герметизация и чтобы на мембране со стороны электрода не было пузырьков воздуха. Для хорошего смачивания системы одна из фирм рекомендует добавлять 3—4 капли жидкости «Kodak Photoflow» на флакон раствора KCl, используемого в этом электроде.

16.3. ХРОМАТОГРАФИЯ

В хроматографии и родственных методах разделения используются различные процессы распределения веществ между двумя фазами, многократно повторяющиеся в элементарных пространствах [17, 21, 23]. Поэтому такие виды хроматографии, как ионообменная, распределительная, адсорбционная, аффинная и гель-проникающая, основанные на различиях в самых разных свойствах разделяемых веществ, можно проводить с помощью однотипного лабораторного оборудования.

16.3.1. Ионообменная хроматография

В этом виде хроматографии сорбция растворенных веществ основана на наличии у них ионного заряда, хотя на разделение могут оказывать некоторое влияние и другие типы связывания. Заряженные группы в подвижной фазе матрицы (остове) могут обмениваться с ионами из раствора:



Матрица может быть изготовлена из поперечно-связанных замещенных смол, таких, как полистирол или по-

лиметилметакрилат, а также из модифицированных углеводсодержащих природных полимеров, например из целлюлозы, декстрана или агарозы.

Существует огромное разнообразие ионообменников, различающихся по функциональным группам, материалу носителя, «чистоте», пористости, хроматографической емкости, размерам частиц, форме, селективности и прочности. Поэтому для получения специальной информации следует обращаться к технической литературе, которую выпускают фирмы, производящие смолы, например фирмы Dow Chemical Co. (смолы дауэкс), Rohm and Haas Co. (амберлайты), Bio-Rad Laboratories, поставляющие большое число различных ионообменников, Pharmacia Fine Chemicals (сефадексы), Reeve Angel Co. и Whatman Co. (целлюлозные ионообменники).

Ионообменные смолы

Существует много синтетических смол с различным числом поперечных связей (сшивок). Более низкая степень поперечного связывания приводит к повышению проницаемости ионообменных смол и увеличению их набухания в воде, а также к появлению у них способности взаимодействовать с молекулами больших размеров. Обменная емкость, отнесенная к объему набухших частиц, и селективность ионообменника повышаются пропорционально числу поперечных сшивок и обратно пропорционально размерам частиц. Таким образом, мелкозернистые ионообменники обладают более высокой разрешающей способностью просто благодаря увеличению числа вовлеченных в разделение веществ обменных циклов. Однако более плотная упаковка малых частиц вызывает уменьшение скорости потока, что в свою очередь требует повышения рабочего давления.

Сорбция, очистка и фракционирование веществ — это основные процессы, для осуществления которых используются ионообменники. При сорбции нужный ион избирательно отделяется от остального материала. При очистке тот или иной ион избирательно сорбируется и затем избирательно элюируется, тогда как все остальные ионы либо не сорбируются, либо задерживаются на ионообменнике. Фракционирование представляет собой

процесс разделения нескольких одинаково заряженных ионов с помощью систем растворитель — растворенное вещество, которые производят последовательное элюирование ионов с постепенно повышающейся величиной заряда.

Чисто эмпирическим путем установлено, что разрешающая способность хроматографического слоя зависит от его длины, а обменная емкость при данном разрешении — от площади поперечного сечения слоя. Поскольку связывание ионов из раствора носит стехиометрический и обратимый характер, необходимое количество смолы можно рассчитать, если известна ее емкость. Как правило, прочность связывания неорганических ионов прямо пропорциональна их валентности (числу зарядов) и обратно пропорциональна атомному номеру. У слабых кислот и оснований прочность связывания зависит от pK ионизируемой группы, если значения pH в данном эксперименте лежат в интервале ее диссоциации.

Обменные противоионы и деионизация

Поскольку ионообменники заряжены противоионом (например, для дауэкса-1 это может быть OH^- , Cl^- , формиат и т. д.), можно практически полностью обменять ион из раствора на заряженный противоион. Так, хлорид можно обменять на OH^- при использовании дауэкса-1, а H^+ — на Na^+ в случае дауэкса-50. Поэтому основное применение ионообменников — это деионизация незаряженных растворенных веществ. Деионизацию можно осуществлять путем пропускания раствора через катионо- и анионообменники или через их смешанный слой, который, правда, трудно регенерировать и обычно приходится выбрасывать. При деионизации углеводов незаряженные сахара могут вести себя как слабые кислоты и сорбироваться сильными анионообменниками. Для этих целей следует применять слабый основной ионообменник.

При ионном обмене соблюдается иерархия в сродстве ионов. Поэтому трудно осуществить прямое замещение иона с высоким сродством на ион с низким сродством. Например, нецелесообразно пытаться превратить

дауэкс-1—Cl в дауэкс-1—формиат одним лишь промыванием муравьиной кислотой или формиатом натрия. Более эффективный способ состоит в переводе хлоридной формы в гидроксильную, а затем гидроксильной — в формиатную. Данные о степени сродства ионов приводятся в брошюрах, выпускаемых фирмами, или в справочниках.

Концентрирование

Благодаря высокому сродству тех или иных ионов к ионообменнику их можно сорбировать на нем из большого объема разбавленного раствора путем пропускания пробы через колонку, заполненную этим ионообменником. Сорбированные ионы можно затем выделить в небольшом объеме элюата, содержащего ионы, имеющие более высокое сродство к ионообменнику или более высокую концентрацию. Таким способом выделяют для анализа обычные и редкие неорганические элементы, а также радиоизотопы и следовые количества органических соединений.

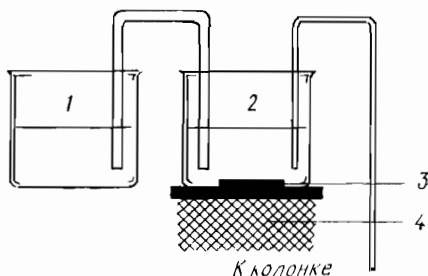
Очистка и фракционирование

Если два иона обладают различным сродством к ионообменнику при данном значении рН, то, чтобы осуществить их разделение, подбирают условия, при которых происходит элюирование только какого-нибудь одного из этих ионов. В подобных исключительных случаях наблюдается «фронтальное» элюирование каждого иона. В тех же случаях, когда сродство ионов одинаково, их разделение все же возможно, если найти условия, при которых ионы элюируются избирательно. Пропускание элюентов в этих условиях через колонку приводит к последовательному элюированию ионов, в результате чего они могут разделиться, если колонка имеет достаточную длину. Однако диффузия ионов ограничивает разрешающую способность колонки и в этом случае. При изменении рН или ионной силы происходит элюирование сорбированных ионов с различными значениями рК или возрастающим сродством.

Градиентная элюция

Элюирование сорбированных молекул путем непрерывного изменения состава элюента — это полезный прием, позволяющий максимально повысить разделительную способность хроматографической системы. Вместо ступенчатого изменения концентрации раствора с помощью различных элюентов осуществляют ее непре-

Рис. 16.5. Система для создания линейного градиента. Площади поверхностей химических стаканов 1 и 2 равны. 3 — стержень для размешивания, 4 — магнитная мешалка.



рывное изменение в заданных пределах. Используемые при этом методики и оборудование могут быть самыми разнообразными — от очень сложных, как в случае девятикамерного прибора для элюирования, применяемого при разделении аминокислот на смоле дауэкс-50 (Na^+), до относительно простого устройства для создания линейного градиента путем смешивания двух компонентов. В последние годы при хроматографии чаще всего используют простой линейный градиент. Для этой цели два сосуда [46] соединяют между собой посредством сифона (рис. 16.5) и один из них (смеситель) присоединяют к колонке. С помощью мешалки, которой снабжен смеситель, поддерживается однородный состав элюента. Если оба сосуда сообщаются с атмосферой и имеют одинаковую площадь поперечного сечения, состав элюента изменяется линейно от состава раствора в смесителе до его состава в резервуаре. Крутизна градиента зависит от объема растворов, содержащихся в обоих сосудах.

Предположим, что необходимо создать такой градиент, чтобы можно было собрать 25 фракций объемом 10 мл, в которых концентрация соли возрастает линей-

но от 0,01 М калийфосфатного буфера (рН 7) до 0,01 М фосфата (рН 7) + 0,01 М KCl. Общий объем, необходимый для создания градиента, равен 250 мл. Прежде всего берут два химических стакана на 250 мл, которые устанавливают так, чтобы их можно было соединить П-образной стеклянной трубкой (рис. 16.5), или используют химические стаканы, один из которых (резервуар) имеет внизу одно выходное отверстие, а другой (смеситель) — два. Смеситель помещают на магнитную мешалку и соединяют выходное отверстие посредством трубки с колонкой. В резервуар добавляют 125 мл фосфатного буфера + KCl, а в смеситель — 125 мл того же фосфатного буфера без KCl. Независимо от этой установки через колонку пропускают сверху некоторое количество 0,01 М фосфатного буфера для уравнивания системы исходным элюентом. Затем начинают элюирование, пропуская через колонку раствор из смесителя. Элюирование продолжают при перемешивании до тех пор, пока все содержимое сосудов не перетечет в колонку. Линейность градиента проверяют, определяя во фракциях количество хлорида. Необходимо предотвратить перемешивание содержимого двух сосудов до начала элюирования, поэтому входное и выходное отверстия в смесителе должны быть снабжены зажимами.

Если отношение площади поперечного сечения резервуара к площади поперечного сечения смесителя больше 1, то градиент будет «выпуклым», а если меньше 1, то «вогнутым», согласно уравнению

$$C_2 = C_1 - D(1 - v)^{A_1/A_2},$$

где C_2 — концентрация раствора в смесителе (нижний уровень), C_1 — концентрация раствора в резервуаре (верхний уровень), D — разность между этими концентрациями, v — доля первоначального объема, вытекшего из сосуда к данному моменту времени, а A_1 и A_2 — площади поперечного сечения сосуда, содержащего раствор с более высокой концентрацией, и сосуда, в котором происходит смешивание растворов, соответственно.

Следует отметить, что при обычном методе создания градиентов, когда элюент с более высокой концентрацией по каплям добавляется из делительной воронки в смеситель, содержащий раствор с постоянным объ-

емом, получают выпуклые градиенты, которые дают недостаточно хорошие результаты.

Более сложные градиенты можно создавать, используя несколько расположенных в ряд сосудов, причем смешивание растворов происходит только в последнем. В каждом из сосудов могут быть разные элюенты, что и приводит к получению сложного градиента. Для этой цели создано градиентное устройство из девяти камер [48].

Нуклеиновые кислоты

Для разделения нуклеотидов, нуклеозидов, пуриновых и пиримидиновых оснований используют анионо- и катионообменники с низкой степенью сшивки. При этом осуществляется строгий контроль ионной силы, рН и неионного связывания. 5'-нуклеотиды разделяют с помощью дауэкса-50W-X4 (Dow Chemical Co.) или AG50W-X4 (Bio-Rad Laboratories). Пробы в 0,1—1 мл элюирующего буфера наносят на колонку длиной 40 см и элюируют 0,1 М формиатом аммония с рН, доведенным до 3,2 муравьиной кислотой, со скоростью 1 мл/мин. Для разделения 2'- и 3'-нуклеотидов используют колонку длиной 85 см, а в качестве элюирующего буферного раствора 0,25 М формиат аммония с рН, доведенным до 4,1 муравьиной кислотой [33]. В другой системе, в которой для контроля неионного связывания применяют градиент соли и этанол, рибо- и дезоксирибоолигонуклеотиды разделяются в зависимости от нуклеотидного состава, длины цепи и наличия 3'- или 5'-концевых фосфатных групп [31]. По одной методике используют колонку размером 60×0,3 см с AG1-X2 (400 меш, Bio-Rad Laboratories). Разделение проводят со скоростью 12 мл/ч, используя для элюции 400 мл 20%-ного этанола, содержащего линейный градиент 0—1,0 М NH_4Cl (рН 10). По второй методике в колонке 100×0,2 см с дауэксом 1-X4 (400 меш) применяется следующая программа введения пробы и элюирования: 0,4 мл 1 М NaOH , 1 мл 20%-ного этанола, по 1 мл воды и пробы, 1 мл 20%-ного этанола, после чего через колонку пропускают 200 мл этанола, содержащего линейный градиент 0—0,5 М NH_4Cl (рН 10), со скоростью 6—10 мл/ч.

Циклические нуклеотиды в гомогенизированной, депротеинизированной и нейтрализованной пробе разделяют на колонке размером $0,5 \times 4$ см со смолой AG1-X8 в формиатной форме (200—400 меш), уравновешенной 0,1 н. муравьиной кислотой. После введения пробы через колонку пропускают по 10 мл воды, 2 М муравьиной кислоты и 4 М муравьиной кислоты, а затем по 10 мл 8 М муравьиной кислоты, содержащей 20 мМ, 100 мМ и 1 М формиат натрия [42].

*Промежуточные продукты цикла
трикарбоновых кислот [44]*

0,5 мл экстракта, доведенного до pH 6, вводят в колонку размером $0,9 \times 14$ см с AG1-X10 в формиатной форме. Для элюирования необходимо 150 мл градиента, создаваемого при добавлении 3 М муравьиной кислоты в закрытый смеситель на 250 мл, наполненный водой. Затем через колонку пропускают 2 н. формиат аммония со скоростью 2 мл/мин. β -Гидроксibuтират, ацетоацетат, сукцинат, малат, пируват, цитрат (изоцитрат), α -кетоглутарат и фумарат элюируются в перечисленном порядке в виде отдельных пиков.

*Ионообменники на основе целлюлозы,
декстрана и агарозы [46]*

При разделении макромолекул используют модифицированные природные полимеры, которые по ионообменной емкости и другим свойствам обычно более пригодны для этой цели, чем искусственные смолы. В случае декстрана и агарозы можно контролировать степень их поперечного связывания и размеры частиц, регулируя тем самым сжатие и набухание ионообменников и обеспечивая их высокую емкость для макромолекул при высоких и средних скоростях потока.

Поскольку белки амфотерны и имеют большое число зарядов, часто сгруппированных в виде скоплений, с ними можно обращаться как с катионами или анионами, выбрав значение pH для их ионообменного разделения на одну или несколько единиц выше или ниже изоэлектрической точки или величины pI. В повторяющихся

Таблица 16.3. Производные целлюлозы и декстрана, используемые в ионообменной хроматографии

Производное	Обозначение	pK
Сульфопропил	СП	Сильная кислота
Фосфоцеллюлоза	Ф	1, 5, 6
Карбоксиметил	КМ	4
Смешанный амин	Эктеола	7, 5
Бензоилированный диэтиламино-этил	БД	9
Диэтиламиноэтил	ДЭАЭ	9, 5
Триэтиламиноэтил	ТЭАЭ	9, 5
Диэтил-2-оксипропиламиноэтил	ДЭОПАЭ	Сильное основание

циклах связывания и элюирования используется изменение рН, приводящее к исчезновению ионных групп, т. е. карбоксильных или аминогрупп на молекулах белка или частицах ионообменника. Элюирование можно осуществлять также путем замещения одного иона другим.

Диэтиламиноэтилпроизводное целлюлозы, декстрана или агарозы представляет собой слабый анионообменник ($pK \approx 9,5$; табл. 16.3). Поэтому в нейтральной среде аминогруппа протонируется и связывает белки и пептиды, если рН среды приблизительно соответствует или превышает величины их pI .

Карбоксиметилпроизводные тех же носителей представляют собой катионообменники с pK около 3,5. Разделение обычно проводят при рН выше 4. Сорбция происходит эффективно, если рН разделения ниже изоэлектрической точки белка и выше 4.

Эктеола-целлюлоза и такое же производное декстрана имеют pK 7,5. Этот ионообменник хорошо зарекомендовал себя при хроматографии нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов.

Практические замечания

Успешное использование ионообменников основано на разумном выборе ряда параметров, таких, как тип обмена, состав буфера, рабочее значение рН, ионная си-

ла, вид матрицы, размер ее частиц, форма и пористость, а также размеры колонки и программа элюирования. Кроме того, необходимо обратить внимание на набивку колонки, введение пробы, поддержание низкой вязкости исследуемого раствора и конструкцию колонки, поскольку эти факторы также определяют степень разрешения. Обсуждение этих аспектов во всех деталях выходит за рамки данной главы, поэтому здесь будут рассмотрены только общие рекомендации по каждому из перечисленных факторов. Подробную информацию по всем этим вопросам можно найти в работе Блэттнера и Эриксона [33], а также в брошюрах, издаваемых фирмами Whatman, Inc. (ионообменные целлюлозы) и Pharmacia, Inc. (сефадексы).

Сферические декстрановые гранулы одинаковых размеров и формы (сефадекс) обеспечивают обычно более высокие скорости потока, хотя выпускаемые сейчас производные целлюлозы также дают хорошие результаты в этом отношении. При использовании шариков или частиц меньших размеров скорость потока снижается и разделение соответственно улучшается. Повышение пористости частиц приводит к увеличению емкости ионообменника для данной молекулы, что особенно важно при работе с макромолекулами. Выбор ионообменника зависит от того, в каких ионных формах находятся вещества, которые предстоит разделять. Выбранное значение pH должно по меньшей мере на одну единицу отличаться от изоэлектрической точки или значения pK для диссоциируемой группы. При работе с анионообменниками по возможности следует применять катионные буферы [алкиламины, аммиак, веронал, имидазол и трис(гидроксиметил)аминометан (трис)], а при использовании катионообменников — анионные буферы (ацетат, веронал, цитрат, глицин и фосфат). Для диэтиламиноэтилсефадекса рекомендуются значения pH от 2 до 9, а для карбоксиметилсефадекса — от 6 до 10. Ионная сила влияет на связывание ионов и, следовательно, на емкость ионообменника. Рекомендуется применять буферы с относительно высокой ионной силой (около 0,1 М), однако их концентрация должна быть несколько ниже, чем та, которая необходима для элюирования нужных ионов.

Разрешающая способность колонки определяется ее высотой. Если зона поглощенных ионов имеет ширину 1—2 см, то для начала рекомендуется использовать слой сорбента высотой 20 см. При заданной высоте слоя емкость колонки линейно зависит от площади ее поперечного сечения.

Элюирование осуществляют, либо изменяя рН, что приводит к уменьшению или устранению ионного заряда, либо путем повышения ионной силы до такой величины, при которой ион буфера вытесняет интересующий нас ион. Элюцию проводят с помощью ступенчатого или постепенного изменения указанных параметров. В случае анионообменников снижают рН или повышают ионную силу, при использовании же катионообменников элюирование осуществляют путем повышения рН или ионной силы.

Вначале необходимо определить либо общее содержание ионов в пробе, либо размеры колонки, так как емкость — это свойство, зависящее от объема ионообменника конкретного типа. Ионный состав пробы должен быть таким же, как и ионный состав исходного буфера. При необходимости ионный состав пробы изменяют на желаемый с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25, диализа или разбавления. Объем пробы не имеет большого значения при всех программах элюирования, кроме того случая, когда в качестве элюента используют только исходный буфер. Пробу следует вводить так, чтобы она не смешивалась с поступающим в колонку элюирующим буфером и чтобы слой сорбента при этом не нарушался.

Как и в других видах хроматографии, в данном случае также имеет большое значение использование специально сконструированных стеклянных колонок, которые удобны для набивки, введения в них элюента и пробы, выдерживают высокое давление (когда оно необходимо), позволяют регулировать скорость потока и предотвращать высыхание сорбента, а также имеют минимальный объем над слоем ионообменника и под ним. Кроме того, необходимо установить критерии, по которым можно судить о достижении поставленной цели, и определить эффективность колонки, анализируя эф-флюент (элюат).

16.3.2. Адсорбционная хроматография

Адсорбция — это процесс, обусловленный вандерваальсовыми силами, электростатическим и гидрофобным взаимодействиями, а также стерическими факторами. Адсорбция индивидуального вещества описывается типичной изотермой адсорбции Ленгмюра, которая представляет собой гиперболу на графике зависимости концентрации растворенного вещества от количества адсорбированного вещества. Такой же кривой описывается и насыщение фермента субстратом, а также «закон убывающего плодородия». Поверхностную сорбцию и элюцию неполярных веществ успешно осуществляют с помощью силикагеля, кизельгура, окиси алюминия, флорисила и активированного угля. Полярные макромолекулы, такие, как белки и нуклеиновые кислоты, очищают либо методом статической сорбции, либо в условиях колоночной хроматографии с использованием гидроксипатита, кальций-фосфатного геля или C_{18} -модификации окиси алюминия.

Типы адсорбентов

Для очистки простых и сложных липидов, жирных кислот, стеролов, фенолов и углеводов используют кремневую кислоту. Элюирование осуществляют путем изменения состава растворителя (обычно от среднеполярного к полярному). Разделение стероидов, алкалоидов, углеводов, сложных эфиров, органических кислот и оснований, а также других органических веществ проводят на нейтральной окиси алюминия (pH 6,9—7,1) в безводных растворителях. Основная окись алюминия (pH 10—10,5) обладает такими же свойствами в отношении соединений, адсорбируемых из органических растворителей. Однако в водной среде она действует как сильный катионообменник, сорбирующий основные соединения, например аминокислоты и амины. Промытая кислотой окись алюминия (pH 3,5—4,5) действует как анионообменник в водной среде. Для очистки макромолекул в водных растворах используются такие адсорбенты, как окись алюминия, C_{18} , кальций-фосфатный гель и гидроксипатит. Они хранятся в виде концентри-

рованных суспензий, которые не очень пригодны для колоночной хроматографии, хотя для гидроксипатита описаны такие методы [45].

Разделение белков

Периодический процесс разделения белков осуществляют путем их адсорбции и последующего элюирования. Условия проведения такой процедуры следует установить в ходе контрольных опытов с каждой партией адсорбента и обычно с каждым препаратом белка (фермента или антитела), предназначенным для разделения. На рис. 16.6 представлены результаты проведения циклов адсорбции и элюирования, полученные в контрольных опытах. На рис. 16.6, А показаны три процесса адсорбции, различающиеся в зависимости от природы очищаемого материала, примесей и других параметров, например рН и ионной силы. Интересующий нас белок может адсорбироваться лучше, чем белки-примеси (слева), так же, как они (в центре), или хуже (справа). В первом случае к раствору добавляют такое количество адсорбента, какое необходимо для извлечения основной части нужного вещества, при этом большинство других белков остается в растворе (положительная адсорбция). Если нужный белок адсорбируется хуже примесей, то адсорбент добавляют, а затем удаляют до тех пор, пока не начнется адсорбция нужного белка (количество адсорбированного белка должно составлять около 10%). В этом случае вначале удаляются белки-примеси (отрицательная адсорбция), после чего нужный частично очищенный материал можно адсорбировать или очистить каким-либо иным способом. Если примесный и основной белки адсорбируются с одинаковой скоростью, адсорбция может привести лишь к небольшой степени очистки. Тем не менее можно добиться положительных результатов, подвергнув очищаемый белок последовательным циклам адсорбции и элюции.

На рис. 16.6, Б показаны три типа элюции. Нужные вещества могут элюироваться раньше, чем белковые примеси (слева), одновременно с ними (в центре) или после них (справа). Если очищаемый материал элюируется раньше, адсорбент следует обрабатывать ограни-

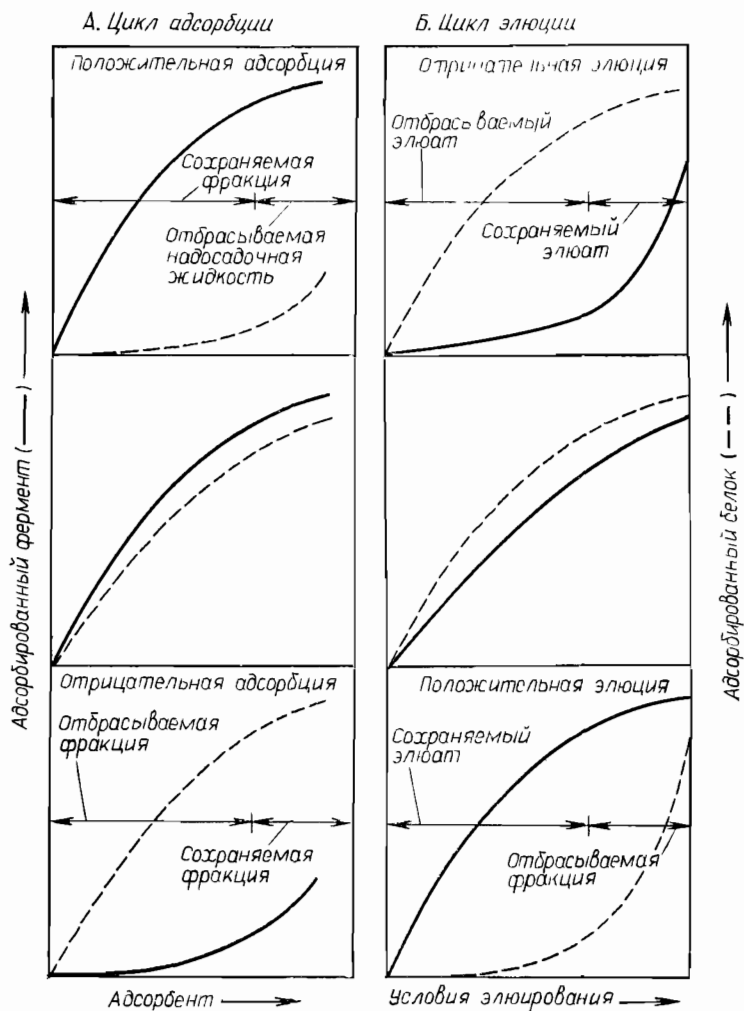


Рис. 16.6. Использование адсорбции и элюции для очистки ферментов (Объяснения в тексте.)

ченным объемом элюента или проводить элюирование циклами для удаления большей части адсорбированного материала, оставляя примеси на адсорбенте. Если вначале элюируются другие белки, адсорбент следует обрабатывать элюентом с возрастающей ионной силой, изменяя рН или сохраняя его прежним до тех пор, пока в элюате не появится значительное количество нужного вещества. Затем условия элюирования изменяют так, чтобы элюировались нужные вещества. Очевидно, что если при адсорбции и элюировании не наблюдается различий в поведении основного вещества и примесей, следует либо заменить данную методику, либо подобрать новые условия.

В такой работе используется главным образом чисто эмпирический подход. Однако график, построенный на основании небольших контрольных опытов, демонстрирующих поведение нужного вещества и примесей, служит хорошим подспорьем при разработке общей методики. Обычно повышение ионной силы и изменение рН в сторону изоэлектрической точки белка приводят к усилению элюирующей способности элюента. Кроме того, субстраты, эффекторы и другие лиганды, связывающие ферменты и другие белки, часто действуют как специфические элюирующие агенты.

Разделение липидов (см. разд. 17.3.3.)

Разделение фосфолипидов с помощью тонкослойной хроматографии описано в разд. 17.3.4.

16.3.3. Жидкостно-жидкостная распределительная хроматография

В двухфазной системе растворителей смесь веществ, частично растворимых в каждом из этих растворителей, после достижения равновесия распределяется между двумя фазами в соответствии с их растворимостью в каждой из фаз. На основе этого явления разработаны полезные методики периодической и непрерывной экстракции различных веществ. Экстракторы для противоточного распределения Крейга и Подбильняка — примеры наиболее удачных аппаратов такого типа. Однако

возможность разделения сходных веществ с помощью этого метода ограничивается числом циклов распределения, которые можно осуществить. К счастью, когда одна фаза двухфазной системы иммобилизована в виде слоя, находящегося на поверхности малых частиц, процесс распределения может многократно повторяться при использовании хроматографии в колонке, заполненной порошком целлюлозы, или на бумаге. При этом вещества разделяются в результате распределения их между водной фазой, покрывающей целлюлозные волокна, и неполярной фазой, протекающей через пространство между волокнами. Кремневая кислота или целит также широко используются в качестве носителей при распределительной хроматографии как в колонках, так и в тонком слое. Разделение веществ с помощью кремневой кислоты в колонках описано в разд. 18.5.2, а в тонком слое — в разд. 17.3.4. Газовая хроматография (разд. 16.3.4) и некоторые виды жидкостной хроматографии под высоким давлением (разд. 16.3.5) также основаны на распределении растворенных веществ.

16.3.4. Газожидкостная распределительная хроматография

Один из наиболее универсальных методов разделения, идентификации и количественного определения биологически важных соединений основан на распределении летучих растворенных веществ между подвижной фазой — газом-носителем — и жидкой фазой, нанесенной на инертные частицы. В принципе с помощью этого метода можно анализировать любое соединение, которое становится летучим или может быть превращено в летучее соединение при температуре до 375 °С. Поэтому газожидкостная хроматография (ГЖХ) нашла широкое применение в бактериологии, особенно при исследовании компонентов клетки, в качестве вспомогательного средства при классификации и как способ количественного определения продуктов метаболизма. Метод отличается высокой чувствительностью и во многих случаях точностью и воспроизводимостью. При этом достигается исключительно высокое разрешение, особенно при использовании капиллярных колонок. Однако для реали-

зации всех возможностей этого метода требуется относительно сложное оборудование и некоторый опыт.

Газожидкостной распределительной хроматографии посвящено много теоретических исследований, результаты которых позволяют заранее предсказывать условия, необходимые для разделения и количественного определения веществ. При использовании этого метода приходится иметь дело с большим числом переменных, включая тип и размеры частиц-носителей, природу и состав жидких фаз, размеры колонок и их конструкцию, природу газа-носителя и скорость его прохождения через колонку, температуру колонки и ее программирование, чувствительность и избирательность детектора. Манипулирование этими переменными обеспечивает гибкость метода и возможность приспособления его к изучению различных проблем бактериологии, однако подробное их обсуждение выходит за рамки данного руководства. Подробное описание применения ГЖХ в бактериологии можно найти в работе Митруки [26]. В последующих разделах даются лишь общий обзор этого метода и две прописи, пригодные для классификации и анализа продуктов метаболизма.

Принцип метода

Газ, содержащий летучее вещество, пропускают через длинную трубку, заполненную частицами инертного материала, покрытого полярным или неполярным веществом, которое находится в жидком состоянии при рабочих температурах. Исследуемое вещество распределяется между газовой и жидкой фазами. Хотя между ними не достигается равновесия, распределение вещества зависит от его относительной растворимости в этих фазах. Зона растворенного вещества движется через колонку со скоростью, отражающей его растворимость в жидкой фазе. Вещества с более низкой растворимостью движутся быстрее, чем с более высокой. Зоны выходят из колонки, распределившись в виде приблизительно симметричных пиков (в зависимости от условий) в соответствии со значениями их коэффициентов распределения.

Приборы

Хотя существует большое разнообразие сложных приборов, предназначенных для ГЖХ, чтобы получить удовлетворительные результаты, достаточно иметь блок с обогреваемым входом для введения проб, термостатом для одной или двух колонок, позволяющим осуществлять контролируемое повышение температуры, обогреваемым детектором, регулятором потока газа и самописцем. Удобно также иметь оборудование для охлаждения термостата, позволяющее сократить время между анализами.

Из нескольких типов существующих детекторов два оказались особенно полезными для микробиологических исследований. Детектор, регистрирующий соединения по их теплопроводности, очень удобен для анализа газов, например газов, выделяемых бактериями. Он состоит из нагреваемой электричеством нити, сопротивление которой в основном линейно зависит от температуры. Перенос тепла на чистый газ-носитель и на его смеси с анализируемыми газами измеряется с помощью моста Уитстона. Детектор обладает средней чувствительностью, а линейность показаний сохраняется в диапазоне концентраций, крайние значения которых различаются между собой в 10^4 раза.

Пламенно-ионизационный детектор — это устройство, в котором создается водородно-кислородное пламя для сжигания в нем анализируемых органических веществ, содержащихся в выходящем из колонки газе. Образующиеся при этом ионы и электроны, проходя через пространство между заряженными электродами, приводят к увеличению силы тока. Ток обнаруживают с помощью электрометра. Детектор такого типа нечувствителен к перманентным газам и воде и очень чувствителен к скорости потока массы (1—10 пг/с). Детектируемые количества вещества определяют путем умножения чувствительности на ширину пика.

Существуют детекторы и других типов. Одни из них специфичны для одного-единственного элемента, другие же регистрируют какой-то один класс молекул, не реагируя на молекулы других классов. Электронозахватный детектор, например, чрезвычайно чувствителен к об-

наружению структур, способных захватывать медленные электроны (например, алкилгалогениды, сопряженные карбонильные группы, нитраты и т. д.), но не реагирует на углеводороды, спирты, кетоны и другие соединения, не захватывающие электроны [25].

Подготовка пробы и получение химических производных

Анализ биологических жидкостей, клеточных экстрактов и других сложных материалов с помощью ГЖХ может оказаться невозможным из-за присутствия высокополярных и высокореактивных компонентов или ряда мешающих примесей. Кроме того, такие неочищенные пробы могут преждевременно загрязнять жидкую фазу. Поэтому обычно проводят предварительное разделение анализируемой смеси для удаления из нее микроорганизмов, компонентов культуральной среды, белков, смол, солей и т. д. Иногда перегнанные или проэкстрагированные пробы можно вводить прямо в колонку. При этом, однако, следует иметь в виду, что данный метод неприменим к водным пробам. В некоторых случаях требуется высушивание, гидролиз или количественная химическая обработка проб для получения летучих производных. Эти процедуры часто являются причинами дополнительных ошибок.

Содержащиеся в пробах вещества с недостаточной летучестью в рабочем диапазоне температуры, необходимо подвергнуть модификации. Это может быть превращение сахаров в триметилсилиловые эфиры, получение метилгликозидов (с помощью метанолиза) полисахаридов и сахарсодержащих гетерополимеров, метиловых эфиров жирных кислот (за исключением короткоцепочечных) и метиловых эфиров N-ацильных производных аминокислот и пептидов, а также образование других производных. Описание специальных методик следует искать в работах, приведенных в списке литературы, а также в других публикациях, где описан анализ веществ, требующих модификации.

Факторы, влияющие на разделение

Колонка. Разрешающая способность колонки возрастает пропорционально корню квадратному из длины разделяющего слоя, а время элюирования линейно зависит от длины этого слоя. Емкость пропорциональна поперечному сечению насадки. Для набивных колонок их длина ограничена максимальным рабочим давлением и вместимостью термостата. Длина капиллярных колонок со слоем неподвижной фазы, нанесенным на их внутренние стенки, ограничена в меньшей степени. Эти колонки могут быть намного длиннее. В большинстве случаев пригодны U-образные или спиральные колонки длиной 2—3 м и внутренним диаметром 2,5 мм, изготовленные из стекла или нержавеющей стали.

Газ-носитель. Для проведения быстрого анализа пробы при высоких скоростях потока, когда происходит быстрая диффузия компонентов пробы, используют водород и гелий. N_2 применяют для приближения к состоянию равновесия между фазами при более низких скоростях потока. Повышение плотности сводит к минимуму диффузию растворенных веществ в газовой фазе.

Температура. Понижение температуры улучшает разделение, а ее повышение сокращает время анализа. Выбор температуры должен быть основан на компромиссном решении, принятом с учетом этих факторов.

Жидкая фаза и материал носителя

Хотя четких правил для выбора жидкой фазы не существует, он определяется до некоторой степени характером растворимости исследуемых веществ. Иными словами, для хроматографии полярных веществ используются полярные растворители, и наоборот. Таким образом, полярные вещества элюируются быстрее в случае применения неполярной жидкой фазы. При разделении гомологов элюирование происходит в соответствии с их температурами кипения. Если перед исследователем не стоят какие-то особые задачи, требующие подбора подходящего материала для набивки колонки, более целесообразно воспользоваться адекватной системой, описанной в литературе.

Анализ бактерий на содержание углеводов

Применяемые для этой цели методики исходят из общих методов анализа углеводов [49], гликосфинголипидов [43] и гликопротеинов [47]. Сахара, связанные гликозидными связями, освобождаются путем метанолиза с выделением О-метилгликозидов, и все свободные сахара также превращаются в метилгликозиды тем же способом. При метанолизе гликозидных связей происходит изменение конфигурации молекулы, однако при этом образуется только один аномер. Из свободных сахаров образуется больше одного аномера, так как в растворе присутствует смесь аномеров.

Собранные и отмытые клетки (около 100 мг сухой биомассы) инкубируют в закрытых пробками пробирках с 2 мкл 4 н. метанольной HCl (раствор газообразной HCl в метаноле) при 75°C в течение 4 ч или 0,5 н. метанольной HCl при 95°C в течение 24 ч. Высушенный гидролизат ресуспендируют в метаноле и высушивают несколько раз для удаления HCl. Осадок растворяют в 1—2 мл сухого пиридина, переносят в маленькую коническую пробирку и добавляют 0,2 мл гексаметилдисилазана и 0,1 мл триметилхлорсилана. Смесь встряхивают в течение 30 с и оставляют на ночь при комнатной температуре. Суспензию центрифугируют, переносят надосадочную жидкость в чистую пробирку и высушивают при 55°C в токе N₂. Осадок экстрагируют 10 мл гексана и экстракт упаривают до 0,25 мл. Пробы анализируют в газовом хроматографе при следующих условиях: температура дозатора 245°C, температура детектора 250°C, газ-носитель N₂, неполярная колонка с 3%-ным OV-1 на газ-хроме Q (60—80 меш), размеры колонки 1,8 м×2,5 мм, температура термостата в течение 5 мин поддерживается при 120°C, после чего ее постепенно повышают до 200°C со скоростью 5°C за 1 мин. Можно использовать также полярную колонку с 15%-ным карбоваксом (20 М, 60—80 меш), нанесенным на промытый кислотой хромосорб W при 120°C.

С успехом применяются и некоторые другие методики [34, 35, 37, 38, 41, 51]. См. также разд. 17.2.

*Кислоты — промежуточные
или конечные продукты метаболизма*
(см. также разд. 16.3.1 и 18.5.2)

Кислоты, образующиеся в цикле трикарбоновых кислот и в реакциях других метаболических путей, такие, как молочная, лимонная, изолимонная, яблочная, янтарная, *цис*-аконитовая, фумаровая, пировиноградная, щавелевоуксусная и глиоксильная, количественно определяют в виде метиловых и триметилсилиловых эфиров. В статье Элкока [29] рассматриваются особые трудности, встречающиеся при анализе некоторых из таких кислот, например ненасыщенных жирных кислот и кетокислот. Хотя имеется подробное описание нескольких методик, в них используются только аутентичные пробы кислот. Экстракцию же кислот из биологического материала осуществить трудно. Описываемая ниже процедура, основанная на методике Элкока [29], успешно применяется для количественного определения кислот, образуемых бактериями и присутствующих в реакционных смесях.

Кислотность пробы объемом 25 мл доводят до pH 2 с помощью серной кислоты, затем добавляют известное количество маргариновой (гептадекановой) кислоты в качестве внутреннего стандарта и раствор высушивают. К сухому остатку добавляют 5 мл реактива метанол—фторид бора (Applied Science Laboratory, State College, Pa.) и смесь количественно переносят в центрифужную пробирку на 50 мл. Суспензию центрифугируют и осадок дважды промывают небольшим количеством реактива метанол—трифторид бора, надосадочные жидкости объединяют и оставляют на ночь. Раствор разбавляют равным объемом воды и экстрагируют трижды 2 мл хлороформа. Слой хлороформа удаляют, экстракты объединяют и избыток хлороформа отгоняют в токе сухого азота.

Хроматографирование можно проводить на 5%-ном диэтиленгликольадипате, нанесенном на очищенный [29] хромосорб W (30—60 меш; длина колонки 244 см, внутренний диаметр 0,64 см), при скорости потока гелия 45 мл/мин. Температуру колонки поддерживают в течение 7 мин при 88°C, а затем повышают ее до 165°C со

скоростью 7,5 °C в 1 мин. Температуру детектора и дозатора устанавливают при 230 °C.

Анализ щавелевоуксусной, пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот с помощью этой методики сопряжен с некоторыми трудностями, которые, однако, удалось преодолеть благодаря получению триметилсилил-оксимных производных этих кислот [40].

16.3.5. Жидкостная хроматография под высоким давлением

Разрешающая способность распределительной хроматографии в системе жидкость — твердый носитель повышается с уменьшением размеров частиц носителя, так как при этом увеличивается число циклов разделения и ускоряется установление равновесия между растворенными веществами и стационарной фазой. Эти положительные явления сопровождаются сильным снижением скорости потока, которую можно повысить до приемлемого уровня только с помощью достаточно высокого давления.

Жидкостная хроматография под высоким давлением (ЖХВД) — это новая и быстроразвивающаяся область с большими аналитическими и препаративными возможностями. Все элементы этого метода, включая твердую насадку, предназначены для работы под давлением от 7 до 550 кг/см². Разделение может быть основано на принципах адсорбции, распределения (в том числе обращенно-фазовый и ионпарный варианты) и ионного обмена [24, 28].

Оборудование

Простая и относительно недорогая система включает насос, создающий высокое давление, манометр, клапан для ввода проб, колонку и коллектор фракций или проточный абсорбционный детектор. Жидкость в насос может подаваться с помощью простого устройства для создания градиентов. Все соединения, крепления и колонка должны быть из нержавеющей стали. Набивку колонки при использовании некоторых твердофазных ма-

териалов можно осуществлять в лаборатории. Однако во многих случаях удобно пользоваться готовыми колонками.

Сорбенты для ЖХВД

Для ЖХВД применяют сорбенты двух типов: сферические стеклянные шарики с пористой поверхностью (или с нанесенным на поверхность пористым слоем) и пористые микрочастицы неправильной формы. Связанный со стеклом тонкий пористый слой на поверхности стеклянных шариков (диаметром 37—43 мкм) имеет толщину около 1 мкм. В этом слое и происходит распределительное, ионообменное, а иногда адсорбционное разделение исследуемых веществ. Поскольку набивка колонки такими шариками легко осуществима, их рекомендуют применять в общих или не очень сложных случаях, а также для набивки колонок в лаборатории. Пористые микрочастицы (диаметром 5—20 мкм, чаще всего 10 мкм) — это близкие по размерам частицы силикагеля или окиси алюминия, используемые для адсорбционного разделения; силикагель служит также основой для других покрытий, которые связываются с ним через силанольные группы. Емкость и разрешающая способность такой колонки с площадью поверхности около 100 м²/г, намного превышающей площадь поверхности шариков, значительно выше. В качестве покрытий применяют полярную цианоаминовую фазу, С₁₈-обращенную фазу, а также сильные анионо- и катионообменники. Для стеклянных шариков, помимо названных, используют полиамидное покрытие и слои слабых анионообменников.

Выбор сорбента и подвижной фазы

В литературе описано довольно большое число методов ЖХВД, и поэтому, прежде чем пытаться подобрать условия для хроматографического разделения, манипулируя множеством переменных параметров, следует поискать уже опубликованное описание методики, применимой к данной конкретной ситуации. Если такой методики нет, то рекомендуется обратиться к тонко-

слоистой хроматографии для подбора подходящего растворителя. В первом приближении водонерастворимые вещества можно разделить путем адсорбции с последующим элюированием в смеси спирт — алкан (5 : 95) или хлороформ — гептан (10 : 90) либо на полярной цианоаминовой фазе, используя для элюции смесь изопропанол — гептан (2 : 98). Водорастворимые ионизирующиеся вещества, если они проявляют кислотные свойства в растворе, разделяют на сильных анионообменниках; если же они представляют собой основания, для их разделения применяют сильные катионообменники. Элюирование можно с успехом провести, используя в первом случае 0,1 М KH_2PO_4 , pH 3,0, а во втором — 0,2 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 3,5. Если при использовании покрытий, в которых происходит распределительная хроматография, растворенное вещество элюируется с фронтом, элюент делают более полярным, если же для элюирования вещества требуется более 30 мин, то применяют менее полярный элюент. В том случае, когда при ионообменной хроматографии образец не связывается с сорбентом, следует снизить ионную силу элюента; если же образец элюируется с большой задержкой, надо повысить ионную силу.

Аминокислоты разделяют на пористых микрочастичах, представляющих собой сильные катионообменники, углеводы — на цианоаминовых полярных фазах, нуклеотиды и циклические нуклеотиды — на сильных анионообменниках, олигонуклеотиды — на обменниках, содержащих алифатические амины, а водорастворимые витамины — на сильных катионообменниках. Это лишь немногие примеры широкого использования ЖХВД.

Разделение триптических пептидов [39]

Аналитическое картирование пептидов триптических гидролизатов белков можно осуществлять с помощью стандартного оборудования для ЖХВД, снабженного приспособлением для создания линейного градиента. Используется готовая обращенно-фазовая колонка $\text{C}_{18}\mu\text{-бондапак}$ (10 мкм, 4 мм $\times$ 30 см, Waters Associates, Milford).

Для получения триптического гидролизата белок, диализованный против дистиллированной воды и затем лиофилизированный, растворяют в 0,2 н. N-этилморфолинацетате (рН 8,1) до концентрации 1 мг/мл и инкубируют с трипсином при соотношении трипсина и белка 1:100 в течение 16 ч при 37°C. Гидролиз прекращают добавлением уксусной кислоты, после чего образец гидролизата вводят непосредственно в колонку для ЖХВД. Пептиды элюируют при комнатной температуре в линейном градиенте 0,1%-ная ортофосфорная кислота — ацетонитрил при скорости потока 2 мл/мин и давлении $34 \cdot 10^5$ — $68 \cdot 10^5$ Па. Фосфорную кислоту фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,5 мкм (Millipore Corp., Bedford), ацетонитрил используется без какой-либо подготовки. За разделением пептидов можно следить, измеряя оптическую плотность элюата при 210 нм; для этого либо вручную отбирают пробы, либо используют детектирование в потоке.

16.3.6. Аффинная хроматография

Аффинная хроматография основана на использовании равновесного состояния высокоспецифического связывания, встречающегося в биологических системах. Этот метод позволяет осуществлять такое разделение веществ, которое невозможно достичь с помощью других способов [19, 20, 22]. Суть метода заключается просто в иммобилизации одного из компонентов образимо связывающейся системы на твердом носителе и последующем его взаимодействии с другим компонентом (компонентами) этой равновесной системы, приводящем к отделению сопутствующих примесей. Таким образом, разделение основано на специфическом связывании компонентов данной системы, а не на различиях в их физических и химических свойствах. Методы аффинной хроматографии хорошо разработаны. Они используются для разделения и очистки компонентов таких высокоспецифически связывающихся комплексов, как антиген — антитело, гормон — связывающий белок, фермент — лиганд. Основными факторами, определяющими процесс разделения, являются природа и химическая струк-

тура матрицы, механизм взаимодействия лиганда с матрицей, наличие удлиняющего «мостика», а также условия сорбции и элюции подвижного связываемого компонента системы. Более подробная информация по этому вопросу содержится в обзорных статьях [19, 20] и в брошюрах, выпускаемых фирмами-изготовителями.

В продаже имеется много различных материалов, применяемых в аффинной хроматографии, в том числе матрицы, или носители, причем связанные с ними удлиняющие «мостики» могут содержать на конце различные функциональные группы или присоединенные к ним широко используемые лиганды, такие, как аденозин-5'-монофосфат. Декстраны, например сефароза 4В (Pharmacia Fine Chemicals) и агарозы, такие, как биогель А (Bio-Rad Laboratories), обладают стабильностью, обеспечивают достаточную скорость потока и имеют удобные размеры частиц, что делает их пригодными для использования в качестве матриц. Разработана химия модификации этих материалов, позволяющей расширить спектр их применения. В случае сефарозы 4В ее связывание с лигандами с помощью аминок групп осуществляют после активации матрицы бромцианом [32]. Частицы сефарозы 4В сферической формы можно изготовить в лаборатории, но они имеются и в продаже, причем в активированной форме.

Если лиганды небольших размеров можно присоединять непосредственно к активированной сефарозе 4В, то крупным лигандам, таким, как белки, часто мешают при этом стерические препятствия, поэтому реакция между матрицей и лигандом протекает медленно и не до конца. Когда же белки вступают в реакцию, то вполне вероятно, что они образуют несколько ковалентных связей с матрицей. К сефарозе, активированной бромцианом, можно присоединить удлиняющие «мостики», которые могут иметь на концах аминок группы, карбоксильные, тиоловые и другие функциональные группы. Замещенную агарозную матрицу можно получить в лаборатории [36] или можно купить готовую агарозу с присоединенным к ней в качестве удлиняющего «мостика» алкиламином, конец которого связан с сукцинил-N-сукцинимидным эфиром. Эта группа реагирует с алкил- или ариламинами.

В случае сефарозы, активированной бромцианом, удлиняющие «мостики» чаще всего получают с помощью реакции с 1,6-диаминогексаном и 6-аминогексановой кислотой. Для присоединения лиганда используют водорастворимый карбодимид, в результате чего образуются амидные связи. В этой реакции гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид или 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимидмето-*n*-толуолсульфонат дают хорошие выходы в водных и не водных средах при pH 4,5—6,0.

Использование сефарозы, активированной бромцианом

Активированную сефарозу можно купить в виде лиофилизированного порошка (1 г соответствует примерно 3,5 мл набухшего геля) или приготовить по методу Аксена и др. [32]. Сухой порошок промывают несколько раз на фильтре из пористого стекла (G-3), используя для промывания по 200 мл 0,1 М HCl. Промывную жидкость удаляют, отсасывая ее с помощью насоса. Промытый и набухший гель применяют сразу же после приготовления.

Методика связывания лиганда или удлиняющего «мостика» с матрицей

Белок или лиганд, содержащий аминокруппы, растворяют в NaHCO₃ (0,1 М, pH 8,3) с добавленным к нему 0,5 М NaCl (только для белков). Берут 5—10 мг белка на 1 мл геля. Следует помнить, что нельзя использовать буферы, содержащие амины. Гель и лиганд медленно перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C (магнитную мешалку при этом нельзя применять). Избыточный белок отмывают исходным буфером, а избыток связывающих групп удаляют, обрабатывая реакционную смесь 1 М этаноламином (pH 9,0) в течение 2 ч. Можно использовать и другие амины, в том числе трис-буфер. Конечный продукт промывают 4—5 раз буферными растворами с высоким и низким pH, например 0,1 М ацетатом (pH 4,0) и 0,1 М боратом (pH 9,0), содержащим

1 М NaCl. Смена рН обычно необходима для удаления адсорбированного белка. Суспензии хранят в холодильнике (не замораживая) и добавляют к ним бактериостатические вещества, если предполагается длительное хранение. Конечно, описанную методику следует модифицировать, если требуется стабилизировать данный белок. Необходимо отметить, что при низких рН CNBr-сефароза стабильна (и не очень реакционноспособна), а при высоких рН становится реакционноспособной.

Аминогексил- или 6-аминогексаноатсефарозу связывают с лигандом карбодиимидным методом. Высушенный материал взвешивают и погружают для набухания в раствор 0,5 М NaCl (1 г=4 мл геля). Предназначенный для связывания лиганд (белок или низкомолекулярное вещество) растворяют в воде или водном растворителе и доводят рН до 4,5. К сефарозе добавляют такой объем водного раствора гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, чтобы получилось 10 мг набухшего геля на 1 мл. Гель и карбодиимид перемешивают в течение ночи при комнатной температуре (нельзя использовать магнитную мешалку). Избыток реактивов удаляют промыванием той же смесью воды и растворителя, которая будет использована на последующем этапе связывания лиганда. Полученный конъюгат можно хранить при 4—8°C. Предназначенный для связывания лиганд растворяют в воде или смеси воды и растворителя, доводя рН водной фазы до 4,5, при этом никакого буфера не используют. Величину рН, которая снижается, главным образом в начале реакции, поддерживают на уровне 4,5, добавляя NaOH. Связанный с лигандом гель тщательно промывают связывающим раствором; нет необходимости блокировать избыточные группы. После промывки в дистиллированной воде, а затем в буфере гель готов для использования в аффинной хроматографии. Материал можно хранить при рН 7,0 и температуре ниже 8°C без замораживания.

Получение замещенного агарозо-аффи-геля 10

Агарозо-аффи-гель 10, используемый в аффинной хроматографии, производится фирмой Bio-Rad Laboratories в виде влажной пасты (1 г сухого веса/25 мл).

Удлиняющий «мостик» и сукцинимидную группу присоединяют к матрице (биогель А) через сукцинилированную аминокислотную группу. Гель промывают на фильтре водой объемом, превышающим в 3 раза объем самого геля. Затем гель смешивают с буфером, например с 0,1 М ацетатом, морфолинпропансульфоновой кислотой (МОПС), N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновой кислотой (ТЕС) или HCO_3^- (рН 5—8,5). Лиганд можно также добавлять в неводном растворителе прямо во влажный сгусток геля или в гель, промытый и суспендированный в растворителе.

Применение связанных с лигандами аффинных сорбентов [20]

Количество необходимого материала для разделения определяют по известной или найденной емкости данного сорбента с некоторыми допущениями в отношении экспериментальных условий, средства сорбируемого материала и т. д. Обычно используется избыточное количество сорбента, и адсорбированные вещества образуют полосу только в верхней части хроматографического слоя, поэтому можно работать с небольшими колонками. Как и при гель-фильтрации, колонки набивают так, чтобы слой сорбента был равномерным и проницаемым для подвижной фазы.

Для адсорбции следует выбрать такой стартовый буфер, который обеспечил бы максимальное связывание, например, белка с лигандом и минимальное взаимодействие между молекулами белка. Таким образом, необходимо учитывать рН и присутствие в реакционной смеси специфических ионов или каких-либо веществ, а буфер должен иметь высокую ионную силу, например содержать 0,5 М NaCl. Пробу вводят в стартовый буфер, и при необходимости ион, содержащийся в пробе, замещают ионом буфера с помощью диализа, мембранного фильтрования или гель-фильтрации.

Элюирование может происходить в результате одного или нескольких сдвигов рН, изменения ионной силы или замещения иммобилизованного лиганда родственным или идентичным веществом. При использовании первых двух способов специфичность, характерная для

аффинной хроматографии, проявляется только на стадии адсорбции. При элюировании путем специфического замещения иммобилизованного лиганда специфичность проявляется как на стадии адсорбции, так и в процессе элюирования.

Другие аспекты

В тех случаях, когда высоко реакционноспособный носитель предстоит связать с макромолекулами, отличающимися большой чувствительностью к избыточному количеству центров связывания, может потребоваться сократить число связывающих групп в матрице. При использовании CNBr-сефарозы и некоторых других материалов это достигается путем регулируемого гидролиза реакционноспособных групп, в других же случаях — с помощью предварительной контролируемой обработки матрицы низкомолекулярным лигандом. Даже при отсутствии у макромолекул такой чувствительности вполне вероятно, что в процессе их связывания с носителем произойдет некоторое нарушение макромолекулярной структуры. У ферментов это проявляется в уменьшении удельной активности и других изменениях каталитических свойств.

После завершения процедуры связывания лиганда с матрицей все оставшиеся реакционноспособные места на матрице следует инактивировать добавлением избытка низкомолекулярного вещества, содержащего ту же реакционноспособную группу, например к сефарозе, активированной CNBr, добавляют этаноламин.

16.3.7. Гель-фильтрация [18, 27]

С помощью сферических гранул с относительно равномерно распределенными по размерам порами можно осуществить различные виды молекулярного разделения, основанные в значительной степени на различиях в размерах молекул. Когда пробу вводят в колонку для гель-фильтрации, насаивая ее на гель, те молекулы, которые по своим размерам намного крупнее пор сферических гранул, проходят через колонку, вытесняя растворитель и не проникая в гранулы. Они выходят в ви-

де пиков сразу же после того, как через колонку пройдет свободный, или внешний, объем растворителя (V_0). Мелкие молекулы, которые свободно уравниваются с растворителем во внутреннем пространстве гранул (внутренний объем V_i), теоретически должны пройти с элюентом через колонку, как если бы гранул вообще не было, и выйти после того, как пройдет общий объем колонки. Молекулы, занимающие промежуточное положение между этими крайними случаями, «распределяются» в пространстве, находящемся внутри и между гранулами, главным образом в соответствии со своими размерами. Благодаря тому что материалы, используемые для гель-фильтрации, имеют поры самых разных размеров и, следовательно, различаются по своим диапазонам фракционирования, с их помощью можно разделять вещества с молекулярными массами в пределах от $1 \cdot 10^2$ до $5 \cdot 10^6$. Если одни молекулы ведут себя «идеально», как это описано выше, то многие другие задерживаются на колонке дольше, чем ожидается. Это обусловлено тем, что такие молекулы связываются с матрицей в результате адсорбции, ионного обмена с небольшим количеством присутствующих в матрице карбоксильных групп или взаимодействия между ароматическими кольцами и матрицей. Таким образом, общий объем колонки V_T равен сумме свободного объема V_0 , внутреннего объема V_i и объема матрицы или гранул V_g :

$$V_T = V_0 + V_i + V_g.$$

Материалы для гель-фильтрации

Существует по меньшей мере четыре вида гранулированных гелей: поперечно-связанные декстраны и их производные, полиакриламиды, агарозы и поперечно-связанные агарозы и стиролдивинилбензолные сополимеры. Размеры гранул и степень их пористости могут быть различными; только две фирмы выпускают 180 различных видов гелей. Перечисление всех характеристик этих гелей не входит в нашу задачу, поэтому более подробную информацию можно найти в брошюрах, выпускаемых фирмами. К тому же в них содержится много сведений общего характера.

Многокомпонентный анализ

Правильно подобрав пористость гранул и тщательно разработав экспериментальные условия, можно разделить очень сходные молекулы или, наоборот, молекулы, относящиеся к совершенно разным классам. Особенно трудно разделить смесь различных веществ, но в этих условиях не так важна высокая скорость потока. Поскольку на небольших колонках обычно получают количественные выходы, после разделения компонентов на неперекрывающиеся пики их можно подвергнуть количественному анализу с помощью неспецифических методов. Таким путем можно разделить, а затем обессолить на сефадексе G-15 ряд простых сахаров, например рафинозу, мальтозу и глюкозу [28]. Такое разделение основано, как правило, на различиях в молекулярных массах анализируемых веществ. Однако иногда оно обусловлено и другими причинами, вызывающими задерживание определенных молекул в колонке, например адсорбцией полярного растворенного вещества из неполярного растворителя.

Определение константы равновесия

По количеству лиганда, обратимо или необратимо связанного с неизвестным количеством высокомолекулярного вещества, можно рассчитать их константу равновесия или стехиометрию связывания [41] (рис. 16.7). Для этого проводят инкубирование данного вещества и лиганда с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-50, причем уравнивание и элюцию осуществляют с помощью раствора с такой же концентрацией лиганда, которая использовалась в эксперименте по связыванию. При элюировании концентрация лиганда в пике белка оказывается выше, чем в элюирующем буфере, за счет связывания лиганда с белком, который в этот момент находится в элюате. На участке кривой элюции, соответствующем общему, или «солевому», объему элюата, образуется впадина. Здесь находится исходная инкубационная смесь, из которой удален лиганд, связавшийся с уже вышедшим из колонки белком. Площадь впадины равна площади пика. Определив количество лиганда, исходя из суммы площадей этих пиков,



Рис. 16.7. Схема элюции для определения равновесного связывания лиганда с белком.

можно рассчитать соответствующую константу равновесия или стехиометрию связывания, если оно очень прочное. Хроматографирование на колонке (40×2 см) с крупно- или мелкогранулированным сефадексом G-50 весьма эффективно. На рис. 16.7 изображена взятая из работы Хаммела и Дрейера [41] кривая элюирования, полученная на колонке с крупногранулированным сефадексом G-25 (0,4×10 см); объем пробы составлял 0,25 мл, а скорость элюирования — 0,3 мл/мин. Значения V_0 и $V_i + V_0$ определяют с помощью декстрана синего и феррицианида соответственно, для того чтобы рассчитать объем элюата, разделяющий два пика. Объем пробы можно увеличить так, чтобы первый пик занимал весь участок кривой между двумя пиками. Однако ввиду размывания пиков следует использовать не более 66% максимального объема пробы. Например, при разделении на колонке размерами 5×50,8 см KCl и альбумина объем пробы может быть равен 30 мл, в процессе элюции проба разводится в 5 раз, а между пиками выходит большой объем элюата. Такое же разделение можно получить при объеме пробы 300 мл и ее разведении в 1,5 раза. В качестве элюата используют воду или буфер. Следует отметить, что эта процедура применяется для удаления молекул малых размеров после химической обработки белков (например, растворимых флуоресцирующих реактивов) и для замены одного буфера другим. В последнем случае используется «обессоливающая» колонка, уравновешенная и промытая новым буфером, который служит также и элюентом.

Фракционирование белков и определение молекулярной массы

При проведении гель-фильтрации в препаративном масштабе, например при очистке ферментов и антител, часто приходится идти на компромисс, выбирая между высокой степенью разрешения и большой скоростью потока. Таким образом, хорошее разделение в какой-то мере приносится в жертву при использовании более крупных частиц геля, позволяющих быстрее пропускать через колонку нужный объем жидкости. Пористость частиц должна быть подобрана (часто эмпирически) так, чтобы можно было разделить как можно больше компонентов и чтобы на кривой элюирования нужный компонент располагался между V_0 и $V_0 + V_1$. Для этого успешно применяется либо только одна гель-фильтрация, либо гель-фильтрация в сочетании с другими способами разделения. Молекулярную массу растворимых белков можно определять с помощью гель-фильтрации на сефадексах G-75 и G-100 [30, 50]. Для этого строят график линейной зависимости отношения V_x/V_0 , где V_x — объем пика неизвестного компонента, а V_0 — свободный объем, от логарифма молекулярной массы ряда ферментов и белков с известными молекулярными массами. Молекулярную массу неизвестного компонента находят по графику. Этот очень полезный метод в основном вытеснен сейчас другим, более быстрым и удобным методом диск-электрофореза в геле (разд. 16.5.1).

Концентрирование

Существует очень простой способ концентрирования растворов высокомолекулярных веществ, не сопровождающегося изменением рН или ионной силы. Для этого к раствору добавляют сухой крупногранулярный сефадекс G-25. Через 10 или более минут исключенную фракцию отделяют путем центрифугирования в центрифуге с подвесными стаканами или с центрифужными пробирками, снабженными специальными вкладышами с фильтрами.

Выбор материала для гель-фильтрации

Материал для гель-фильтрации должен иметь интервал фракционирования, соответствующий данной цели. Для полного исключения исследуемого вещества используют гель с интервалом фракционирования, верхний предел которого значительно ниже, чем молекулярная масса этого вещества, например, для исключения большинства белков применяют сефадекс G-25 (интервал фракционирования для молекулярных масс от 100 до 5000), а для веществ с молекулярной массой выше 3000 — сефадекс G-10 (интервал фракционирования для молекулярных масс от 0 до 1500). Для полного уравнивания анализируемого соединения с жидкостью во внутреннем объеме геля (V_1) и последующего элюирования его с «солевым» объемом ($V_0 + V_1$) выбирают гель с интервалом фракционирования, нижний предел которого превышает молекулярную массу данного соединения. При фракционировании вещества (или веществ) гель должен иметь такой интервал фракционирования, при котором это вещество (или вещества) элюировалось бы с некоторой задержкой, например, для фракционирования сывороточных белков используют сефадекс G-200 (предел исключения 200 000), а для определения их молекулярных масс — биогель А, 0,5 М (предел исключения 500 000).

Степень разрешения зависит главным образом от скорости потока, которая в свою очередь связана с размером и однородностью гранул. Наивысшая степень разрешения достигается при использовании очень мелких гранул и низкой скорости потока. В случае биогелей Р и А для получения максимально возможной степени разрешения необходима скорость потока 2—10 мл/ч на 1 см² поперечного сечения слоя гранул, что намного ниже максимальной скорости свободного истечения жидкости для некоторых других гелей. Применение наиболее пористых гелей, например биогелей А50 и 150 М (200—400 меш), требует повышенного гидростатического давления. При использовании биогелей Р-2, Р-4 и Р-6 (400 меш), обеспечивающих разделение малых молекул с высоким разрешением, давление можно

повысить до нескольких атмосфер. Величина максимально возможного давления указана в брошюрах, выпускаемых фирмами-изготовителями. При использовании некоторых высокопористых материалов разрушение структуры гранул приводит к сильному снижению скорости потока.

При получении биологических материалов редко создаются такие химические условия, которые могли бы вызвать разрушение матрицы геля. Однако мы приведем здесь в качестве ориентиров некоторые общие характеристики устойчивости нескольких гелей. Декстраны, такие, как сефадекс, устойчивы в растворах солей, органических растворителях, растворах щелочей и слабых кислот, но гидролизуются в сильных кислотах. Декстраны во влажном и в сухом состоянии устойчивы при выдерживании их в течение 30 мин при 121 °C и pH 7,0.

Агарозы, например сефарозы, не содержат поперечных сшивок и, следовательно, могут храниться при pH от 4 до 9 и температуре от 2 до 30 °C. Они устойчивы в 1 М NaCl и 2 М мочеvine. Поперечно-связанная агароза (сефароза CL) устойчива при pH от 3 до 9, однако при ее использовании следует избегать условий, способствующих ее окислению. Она высокоустойчива в 3 М тиоцианате калия, сильном хаотропном агенте. Перенесение сефарозы CL из воды в некоторые органические растворители сопровождается лишь небольшим изменением размеров пор. Ее можно многократно стерилизовать при pH 7,0 и температуре 110—120 °C.

Полиакриламиды, такие, как биогель Р, достаточно устойчивы в разбавленных органических кислотах, 8 М мочеvine, 6 М гуанидингидрохлориде, хаотропных агентах и детергентах. Для разделения белков рекомендуется использовать буферы с ионной силой 0,5 М. В присутствии некоторых смешивающихся с водой растворителей, например спирта (до концентрации 20%), размеры пор фактически не изменяются. Биогель Р устойчив при комнатной температуре (pH 2—10) и при автоклавировании (121 °C, pH 6—8).

Конструкция и размеры колонок

Во многих случаях применения гель-фильтрации, например при обессоливании растворов, не требуется высокого разрешения, и, следовательно, для этих целей можно использовать самодельные или одноразовые ординарные колонки. Однако в ответственных случаях для успешного разделения веществ с помощью гель-фильтрации, как и во всех других видах хроматографии, нужна надлежащим образом сконструированная колонка и другое связанное с ней оборудование. Следует обратить внимание на то, что над слоем геля и под ним не должно быть значительного «мертвого» объема, в котором происходит смешивание протекающих через него растворов. При наличии такого объема искажается форма градиента и элюирующихся пиков, а также характер ступенчатого изменения состава элюента. В продаже имеются колонки, в которых фактически нет «мертвого» объема под слоем геля. В колонках другого типа «мертвое» пространство отсутствует как снизу, так и сверху хроматографического слоя благодаря тому, что эти колонки снабжены специальными приспособлениями для введения элюента и отбора элюата. Такие приспособления полезны также при проведении восходящей хроматографии. Не рекомендуется применять поддерживающие пластинки из пористого стекла, особенно в случае гелей с низкой степенью сшивки и высокой пористостью.

Разрешение зависит от длины колонки, емкость которой пропорциональна площади ее поперечного сечения. Однако применение гелей с меньшими размерами частиц повышает степень разрешения и позволяет использовать более короткие колонки. Поскольку ширина зоны нанесенного на гель образца определяется также его объемом, длину и ширину колонки выбирают в зависимости от той степени разрешения, которую необходимо достичь при данном объеме пробы: для более эффективного разделения требуется более длинная колонка, а для получения более узкой исходной зоны — более широкая. На колонке с высотой хроматографического слоя 51 см легко обессолить белок, получив его в небольшом объеме элюата, тогда как, например, для

частичного разделения набора пептидов, образовавшихся при расщеплении какого-либо фермента цианбромидом, нужна более длинная колонка (300 см). Наиболее приемлемы колонки с внутренним диаметром 2,5 см, хотя можно использовать и более узкие. При применении очень узких колонок возникают стеночные эффекты за счет большего вклада ламинарного потока, расширяющего хроматографические зоны. При чрезмерно большом диаметре неизбежны ненужное разбавление и трудности, связанные с поддержанием горизонтальной формы зон.

Заполнение колонок

Количество сухого геля, требуемое для заполнения данной колонки, можно рассчитать по объему набухшего геля, который приводится в брошюрах, выпускаемых фирмами-изготовителями. Для гелей, поставляемых в виде суспензии, необходимость в таких расчетах отпадает. В этом случае гелю дают набухнуть, выдерживая его в объеме элюента, вдвое превышающем ожидаемый объем набухшего геля. Время, необходимое для набухания геля, зависит от объема впитываемой жидкости. Для набухания гелей с высокой степенью сшивки и низкой емкостью, таких, как сефадексы G-10, G-15, G-25, G-50 и HL-50, а также биогель Р, требуется 3—4 ч при комнатной температуре, тогда как сефадексы G-75—G-200 набухают в течение 1—3 дней. При температуре 90—100 °С это время сокращается до 1—5 ч. Набухание в кипящей воде способствует удалению пузырьков воздуха, от которых приходится избавляться под вакуумом, если набухание проводится при комнатной температуре. Гели, выпускаемые в набухом виде, разбавляют до такой степени, чтобы легко можно было удалить все пузырьки воздуха. Следует избегать перемешивания. Набухшему гелю дают постоять некоторое время, а затем избыточный растворитель сливают для получения густой суспензии, консистенция которой все-таки не мешает удалению пузырьков воздуха. Гели, поставляемые в виде суспензии, при необходимости разбавляют до такой же консистенции.

Колонку устанавливают, закрепляя ее в вертикальном положении. Затем в нее подают элюент, лучше всего снизу, до тех пор пока мертвое пространство под слоем геля не будет заполнено и из него не выйдут все пузырьки воздуха. Закрыв выходное отверстие колонки, вливают в нее сразу всю суспензию геля, распределяя ее равномерно по стенке колонки или наливая на палочку. Затем добавляют элюент до самого верха колонки, подсоединяют ее к резервуару с элюентом и выпускают все оставшиеся пузырьки воздуха через отверстие в верхней части колонки. Если невозможно ввести в колонку всю суспензию геля за один прием, к колонке присоединяют удлинитель и сразу же начинают вливать в нее суспензию. Не рекомендуется заполнять колонку жидкой суспензией, вводить суспензию в колонку, содержащую элюент, или добавлять ее в несколько приемов. Нельзя допускать обсыхания хроматографического слоя. Чтобы избежать этого, выходную трубку изгибают в виде петли, расположенной выше поверхности геля.

Ввод пробы

Перед вводом пробы на поверхность геля помещают либо кружок фильтровальной бумаги, либо перфорированный пластмассовый диск, либо специальное приспособление для введения проб, которое представляет собой пластмассовый цилиндр с дном из нейлоновой сетки. Затем проверяют гомогенность хроматографического слоя, а также определяют свободный объем (V_0) и объем жидкости ($V_0 + V_1$), пропуская через колонку смесь декстрана синего (2 мг/мл) и феррицианида калия или какого-то другого окрашенного вещества с небольшими размерами молекул.

Пробу осторожно настилают на поверхность геля после удаления избытка элюента. Выходное отверстие колонки должно быть открыто до тех пор, пока проба не войдет в слой геля. Стенки колонки над поверхностью геля промывают небольшим количеством элюента. Затем колонку осторожно заполняют элюентом и после удаления из нее, а также из соединительных трубок пузырьков воздуха колонку присоединяют к резер-

вуару, в котором поддерживается постоянный уровень элюента (сосуд Мариотта). Такой сосуд представляет собой колбу с выходным отверстием у дна, соединенным через трубку с колонкой. Колба закрывается сверху пробкой с проходящей через нее стеклянной трубкой, которую можно установить на нужную высоту. Трубка расположена ниже поверхности элюента и поддерживает постоянное гидростатическое давление.

Пробу можно также наносить на поверхность геля, не удаляя находящийся над ним слой элюента. В этом случае проба должна быть более плотной, чем элюент. При необходимости добавляют сахарозу или какую-либо соль. Наслаивание пробы производят с помощью пипетки или капиллярной трубки, присоединенной к шприцу. Фирма Pharmacia, Inc. разработала и поставляет проточные соединительные устройства (адапторы) для своих колонок. Они представляют собой своего рода пробки, соединенные с нарезными трубками, проходящими через концы колонки и заканчивающиеся капиллярными шлангами. Два таких адаптора, тесно примыкающие к внутренним стенкам колонки, можно плотно пригнать с помощью нарезных стержней к нижней и верхней поверхностям геля. При этом пробу наносят непосредственно на слой геля, затем пропускают элюент, который вытекает через нижнюю поверхность геля.

Элюирование

Скорость потока можно регулировать, изменяя гидростатическое давление, которое определяется высотой столба жидкости от ее уровня в резервуаре с элюентом и до выходного отверстия в колонке, до тех пор пока не будет превышено максимальное давление, допустимое для данного вида геля. Резервуар с элюентом, или сосуд Мариотта, как и любое другое аналогичное устройство, а также выходной конец трубки устанавливают так, чтобы разница между уровнем жидкости в резервуаре или в трубке сосуда Мариотта и ее уровнем в выходном отверстии колонки не превышала допустимой разницы в высоте столба жидкости (гидростатическом давлении). Постоянную скорость истечения жидкости можно также поддерживать с помощью насоса, соблю-

дая те же предосторожности. При использовании гелей с высокой степенью сшивки максимальная скорость гравитационного потока намного превышает скорость потока, необходимую для достижения оптимального разделения или получения острых пиков. Если степень сшивки геля невелика, скорость потока может быть ограничена только допустимым гидростатическим давлением. В том случае, если жидкость протекает под действием силы тяжести, уровень элюента и скорость потока поддерживаются постоянными с помощью сосуда Мариотта.

Факторы, влияющие на остроту пиков

Для достижения наивысшего разрешения необходимо, чтобы свободный объем хроматографического слоя находился в равновесии с внутренним объемом гранул. При гель-фильтрации смесей веществ с приблизительно одинаковыми размерами молекул это возможно только при очень низких скоростях потока. Таким образом, при установлении скорости потока необходимо учитывать время разделения и разрешающую способность. В аналитической работе основная роль принадлежит разрешению, тогда как в препаративных опытах важнее быстрота разделения. При гель-фильтрации на сефарозах используется скорость от 2 до 8 мл/см²/мин, при обессоливании на сефадексе G-15 хорошие результаты получают при скорости 12 мл/см²/мин, а при разделении на сефадексе G-200 скорость может составлять от 5 до 20 мл/см²/мин.

Картина элюции, т. е. форма пиков, сильно изменяется в зависимости от вязкости пробы. Поэтому для сохранения соответствующей формы пиков пробы, содержащие сахарозу или белки в очень высокой концентрации, следует разбавлять так, чтобы их относительная вязкость не превышала относительной вязкости элюента более чем в два раза.

Хранение

Если колонка не используется более одной недели, необходимо принять меры для предотвращения ее микробного загрязнения. Для этого в нее вводят азид нат-

рия (0,02%), хлоретон (0,05%), мертиолат (0,005%) или хлоргексидин (0,002%). Хлороформ, бутанол и толуол не следует применять. Перед использованием колонки антимикробные агенты удаляют, пропуская через нее элюент.

16.4. РАДИОАКТИВНОСТЬ [52—54]

В большинстве бактериологических исследований для выполнения намеченной экспериментальной программы можно с успехом использовать радиоактивные изотопы. Выбор радиоактивного изотопа зависит от периода его полураспада, типа распада и выделяемой при этом энергии, а также от ряда других факторов, специфичных для каждого эксперимента. Длительностью периода полураспада используемого изотопа определяется стратегия проведения данного исследования, а также необходимость внесения поправок на распад изотопа во время эксперимента. В зависимости от типа распада и выделяемой энергии выбирают тот или иной счетчик, эти же факторы обуславливают и степень разрешения

Таблица 16.4. Физические свойства некоторых радиоактивных изотопов

Изотоп	Период полураспада	Тип	Энергия, МэВ	Удельная активность	
				теоретический максимум, мКи/миллиатом ¹	обычные значения для соединений (мКи/ммоль)
Тритий (³ H, T)	12,26 лет	β	0,018	$2,92 \cdot 10^4$	$10^2—10^4$
Углерод-14 (¹⁴ C)	5730 лет	β	0,159	62,4	$1—10^2$
Сера-35 (³⁵ S)	87,2 дня	β	0,167	$1,50 \cdot 10^6$	$1—10^2$
Хлор-36 (³⁶ Cl)	$3 \cdot 10^5$ лет	β	0,714	1,2	$10^3—10$
Фосфор-32 (³² P)	14,3 дня	β	1,71	$9,2 \cdot 10^6$	$10—10^3$
Иод-131 (¹³¹ I)	8,06 дня	β γ	0,81 0,08—0,72	$1,62 \cdot 10^7$	$10^2—10^4$
Иод-125 (¹²⁵ I)	60 дней	γ	0,035	$2,18 \cdot 10^6$	$10^2—10^4$

¹ Миллиатом — атомная масса элемента в миллиграммах.

при выявлении радиоактивности с помощью фотоэмульсий. В табл. 16.4 приведена информация об изотопах, наиболее часто применяемых в биологии. К сожалению, не получены радиоактивные изотопы азота и кислорода, пригодные для их использования в научных исследованиях. Чаше всего в биологических работах измеряют радиоактивность β -частиц (электронов) и γ -лучей. β -Излучение, испускаемое, например, тритием и ^{14}C , можно измерить с помощью соединенной с электрометром ионизационной камеры для подсчета импульсов в газе, счетчика Гейгера, а также методами пропорционального счета (обычно с карбонатом бария) или сцинтилляционного счета. Мы ограничимся описанием лишь жидкостного сцинтилляционного спектрометра, вытеснившего за последние годы все остальные счетные устройства. Счетчики, регистрирующие γ -излучение, применяются в основном для измерения ^{131}I и ^{125}I .

16.4.1. Обеспечение безопасности при работе с радиоактивными изотопами

Применение радиоактивных изотопов с любой целью строго регулируется Комиссией по ядерному контролю. В круг обязанностей основной организации, под руководством которой проводятся данные исследования, входят обычно выдача разрешений на использование тех или иных радиоактивных материалов и периодическое инспектирование работы лабораторий. Со своей стороны эта организация через сотрудника, ответственного за технику безопасности, требует от персонала лаборатории соблюдения всех принятых мер предосторожности и ведения учета радиоактивных материалов в соответствии с установленными правилами работы с радиоактивными изотопами. Ниже приведены основные из этих правил.

1. Исследования с применением того или иного радиоактивного изотопа следует проводить в специально предназначенном для этого лабораторном помещении. Для работы с летучими радиоактивными соединениями, например $^3\text{H}_2\text{O}$, требуется отдельный отсек с вытяжным шкафом. Количество использованных материалов и уничтожение радиоактивных отходов необходимо конт-

ролировать. Приспособления для приема отходов, уборки рабочих мест и очистки инвентаря всегда должны быть в полной готовности.

2. На рабочем месте запрещается есть, пить и курить.

3. Нельзя всасывать жидкость в пипетку ртом.

4. Необходимо работать в специальной одежде, перчатках и защитных очках.

5. Все контейнеры с радиоизотопами должны быть снабжены специальными этикетками с указанием радиоактивности и других необходимых данных.

6. По возможности следует применять лабораторный инвентарь одноразового пользования и складывать его после проведения экспериментов в специальные контейнеры для твердых отходов.

7. Всю лабораторную стеклянную посуду перед ее использованием в обычных опытах следует тщательно промыть и проверить на радиоактивность.

8. Необходимо проводить регулярную инвентаризацию и регистрацию используемых изотопов.

9. Перед уходом из лаборатории следует проверить на радиоактивность рабочее место, одежду и руки.

10. В случае утечки радиоактивности об этом необходимо поставить в известность всех сотрудников лаборатории и ответственного за технику безопасности.

Счетчик Гейгера с тонкостенным окном позволяет обнаруживать все изотопы, за исключением трития, для регистрации которого требуется сцинтилляционный счетчик. При работе с источниками γ -излучения с радиоактивностью свыше 100 мкКи, а также с ^{32}P и другими изотопами, испускающими жесткое β -излучение, персонал должен быть снабжен индикаторными пленками для обнаружения радиоактивности. В случае применения ^{14}C , ^3H и ^{35}S такие пленки не требуются. Однако лицам, использующим эти изотопы в количестве порядка милликури, необходимо периодически делать анализ мочи. Организация таких анализов наряду с обеспечением лаборатории индикаторными пленками и средствами ликвидации отходов часто входит в обязанность сотрудника, ответственного за технику безопасности.

Детекторы радиоактивности следует защищать от загрязнения. Поэтому они должны находиться в специально отведенном для них помещении, причем особое

внимание необходимо уделять чистоте наружной стороны флаконов для подсчета импульсов; флаконы должны быть снабжены плотно закрывающимися крышками, предотвращающими утечку радиоактивности; при замене образцов нужно соблюдать большую осторожность, чтобы случайно не разбить флакон и не пролить жидкость. Работу с высоким и низким уровнями радиоактивности следует проводить в разных местах. По окончании эксперимента необходимо произвести уборку рабочего места. Стекланную посуду и другой инвентарь нельзя оставлять грязными в не предназначенном для этого месте, чтобы их не могли использовать другие сотрудники. Старые радиоактивные материалы не следует считать распавшимися, до тех пор пока не будет доказано, что это не так.

Третий и ^{14}C в количествах, используемых в большинстве экспериментов, не представляют радиационной опасности. Вместе с тем $^3\text{H}_2\text{O}$ — это летучее вещество, а газ $^3\text{H}_2$, применяющийся для введения метки, обладает очень высокой удельной активностью, что требует при обращении с ним особых предосторожностей. Хотя ^{14}C испускает мягкое β -излучение, он имеет очень большой период полураспада (5000 лет), поэтому его включение в биологический материал, например в дезоксирибонуклеиновую кислоту или кости, опасно из-за длительного воздействия. ^{35}S и ^{32}P , имеющие относительно короткие периоды полураспада (87,1 и 14,3 дня соответственно), испускают жесткое β -излучение. При работе с большими количествами этих веществ следует находиться за радиационным укрытием (свинцовыми плитами) и следить за уровнем радиации на рабочем месте.

16.4.2. Экспериментальные методы

Чистота меченых соединений

Поставляемые коммерческими предприятиями меченые соединения обычно отличаются высоким качеством, причем следует помнить, что как радиохимическая, так и химическая чистота соединения может иметь решающее значение в предстоящем эксперименте. Поэтому необходимо убедиться по крайней мере в том, что примеси, если они присутствуют, не влияют на ход эксперимента.

Радиохимически чистое соединение содержит только один вид радиоактивной молекулы, но определение радиоактивной чистоты не дает никаких указаний на присутствие в этом соединении нерадиоактивных примесей. Радиохимическую чистоту данного соединения можно определить с помощью хроматографии и обратного изотопного разбавления (см. ниже), т. е. добавления такого же, но нерадиоактивного чистого соединения (носителя) с последующим выделением этого соединения и определением в нем удельной активности. Если исследуемое соединение радиохимически чистое, то его вновь определенная удельная активность совпадает со значением, ожидаемым при простом разбавлении его нерадиоактивным соединением. Если же в веществе содержатся радиоактивные примеси, то при его выделении вместе с носителем получится препарат, в котором уже не будет этих примесей, и его удельная активность окажется ниже ожидаемой. Если примесь нерадиоактивна, удельная активность выделенного препарата будет выше той, которая должна быть после разбавления носителем. В том случае, когда известно, что собой представляет примесь, ее концентрацию можно определить с помощью изотопного разбавления, т. е. добавления чистого нерадиоактивного вещества, присутствующего как примесь, с последующим выделением препарата и измерением его удельной активности. Химическую чистоту определяют обычными методами, такими, как спектрофотометрия, дисперсия оптического вращения, газожидкостная хроматография и т. д.

Радиохимическая и химическая чистота соединения может заметно изменяться при хранении, что обусловлено главным образом его радиационным повреждением вследствие высокой удельной активности препарата. Этот процесс можно свести к минимуму, выполняя как можно точнее специальные указания фирм-изготовителей или одно из следующих более общих правил. Препараты радиоактивных соединений необходимо: 1) хранить при самой низкой практически возможной удельной активности; 2) разделять на отдельные более мелкие партии; 3) если данный препарат представляет собой твердое вещество, то его нужно хранить в сухом состоянии; 4) хранить в вакууме или в атмосфере инертного газа;

5) хранить в чистом бензоле при 5—10°C; 6) к водорастворимым веществам, не растворяющимся в бензоле, добавлять этиловый спирт до концентрации 2—10%; 7) хранить при возможно более низкой температуре. Водные растворы ^3H -соединений не следует замораживать. Твердые вещества часто не требуется хранить под вакуумом или в атмосфере инертного газа, их можно держать в сухом состоянии в завинчивающихся флаконах. Ампулы с летучими материалами и жидкостями запаивают под вакуумом или в токе инертного газа.

Методы изотопного разбавления

Радиоактивные соединения можно использовать для определения количества тех же, но немеченых соединений, присутствующих в смеси с другими веществами. Для этого необходимо знать удельную радиоактивность (УР) и количество добавленного в смесь радиоактивного соединения. Затем из смеси выделяют какую-то часть очищенного соединения и определяют его удельную радиоактивность. Содержание немеченого соединения в смеси рассчитывают по уравнению

$$\text{Количество немеченого соединения (г)} = \text{Количество добавленного радиоактивного соединения (г)} \times \frac{\text{УР}_{\text{исходная}}}{\text{УР}_{\text{конечная}}} - 1.$$

Соединение считается чистым в том случае, когда удельная радиоактивность после нескольких повторных выделений препарата (или рекристаллизации) остается постоянной.

С помощью обратного метода можно измерить общее количество содержащегося в смеси радиоактивного соединения. Для этого к пробе добавляют очищенное нерадиоактивное соединение, а затем его вновь выделяют. Исходная удельная радиоактивность соединения и количество нерадиоактивного носителя должны быть известны, а конечную удельную радиоактивность определяют после выделения из смеси препарата. Количество радиоактивного материала рассчитывают по формуле.

$$\text{Количество неизвестного (радиоактивного) вещества (г)} = \text{Общее количество (носитель плюс неизвестное вещество) (г)} \times \frac{\text{УР}_{\text{конечная}}}{\text{УР}_{\text{исходная}}}.$$

Метод двойного изотопного разбавления с успехом используется для выделения очень малых количеств веществ, например для извлечения стерола из какого-нибудь гомогената с помощью многоэтапной процедуры, приводящей лишь к частичному выходу очищенного соединения. К гомогенату можно добавить ^{14}C -стерол с известной общей радиоактивностью. Выход стерола на последнем этапе очистки определяется по общей ^{14}C -радиоактивности выделенного очищенного соединения. Согласно другой методике, получают какое-либо производное стерола, проводя соответствующую реакцию либо в неочищенном экстракте, если это удобно, либо на одном из самых ранних этапов очистки. Например, для получения ацетилового эфира стерола можно использовать уксусный ангидрид, меченный ^3H . По содержанию ^3H в выделенном материале определяют исходное количество стерола. Для этого необходимо знать только удельную радиоактивность уксусного ангидрида. Итак,

$$\text{Выход стерола} = \frac{\text{Радиоактивность выделенного стерола (имп/мин)}}{\text{Радиоактивность добавленного стерола (имп/мин)'}}$$

$$\text{Количество стерола (мкмоль)} = \frac{\text{Количество } ^3\text{H соединения (мкмоль)}}{\text{Выход}} =$$

$$\frac{\text{Радиоактивность } ^3\text{H-соединения (имп/мин)/Эффективность счета}}{\text{УР уксусного ангидрида (мкКи/мкмоль)}} = \frac{\text{Выход}}{\text{Выход}},$$

$$1 \text{ мкКи} = 2,22 \cdot 10^6 \text{ расп./мин.}$$

Определение необходимого количества радиоизотопа

Как правило, суммарная радиоактивность должна в умеренной степени (вдвое) превышать минимум, необходимый для определения конечной или самой низкой активности образцов. Это позволяет избежать вредного влияния радиации и загрязнения лабораторного оборудования, а также максимально повысить уровень безопасности при проведении экспериментов. Проще всего, естественно, при расчетах исходить из радиоактивности, указанной в опубликованных работах, в которых описаны подобные эксперименты, внося в эти расчеты соответствующие поправки на изменение объемов, характери-

стик приборов и т. д. Если это невозможно, следует начать с минимальной скорости счета, дающей удовлетворительные результаты (разд. 16.4.4). Затем на основе полученных данных рассчитывают необходимое общее количество активности (число распадов в 1 мин).

В расчетах следует учитывать многие из перечисленных ниже факторов: период полураспада изотопа, длительность эксперимента, исходный объем образца, коэффициент разбавления, эффективность счета, молярную удельную активность, объем анализируемого образца, период биологического полураспада соединения, потери вещества при выделении, чистоту и устойчивость, а также метаболические превращения меченого соединения.

Представим, что необходимо выделить на колонке меченный тритием метаболит, полученный при инкубировании глюкозы в $^3\text{H}_2\text{O}$. Материал, элюирующийся из колонки, распределяется в пяти фракциях по 10 мл и содержит один атом ^3H на одну молекулу метаболита. Выход метаболита в расчете на глюкозу, добавленную после разделения, составляет 5% при учете всех факторов, влияющих на образование метаболических пулов, а также побочных реакций и потерь при выделении. Для выделения метаболита используют половину всей инкубационной смеси.

В этом эксперименте выделенный материал содержит изотоп ^3H , включенный в него из молекул H_2O . В процессе включения протоны весьма успешно конкурируют с $^3\text{H}^+$ благодаря их значительному численному превосходству, а также изотопному эффекту, обусловленному различиями в массах и химических характеристиках протонов и ионов $^3\text{H}^+$. Допустим, что этот эффект для протона в 4 раза больше, чем для $^3\text{H}^+$.

Чтобы получить хорошие результаты при подсчете импульсов, раствор, в котором проводится измерение радиоактивности, должен содержать не более 0,5 мл растворенного в воде образца. В нашем примере раствор будет содержать 0,2 мл образца. Эффективность счета для ^3H равна 43%, при этом тушение составляет 20%. Иногда эффективностью счета называют сумму этих двух величин. Для ^{14}C и ^3H не требуется вносить поправки на распад радиоактивности.

Учитывая, что при измерении радиоактивности может быть допущена ошибка в счете (см. ниже), подсчитаем 5000 распадов. Поскольку сцинтилляционный счетчик может работать непрерывно не более 1—2 ч, для получения такого счета необходимо затратить по 10 мин на образец. Таким образом, образец объемом 0,2 мл должен содержать радиоактивность, соответствующую 500 имп/мин для фракции с самой низкой активностью. Можно подсчитать, что доля общей радиоактивности, распределенной по пяти фракциям, составляет в каждой из них 5, 20, 50, 20 и 5%. Следовательно, скорость счета для каждого образца объемом 0,2 мл должна быть равна 500, 2000, 5000, 2000 и 500 имп/мин или 8000 имп/мин для всех пяти образцов, взятых из элюата объемом 50 мл. Продолжим наши расчеты: $8000 \text{ имп/мин} \cdot 50$ (общий объем образца) $\cdot 2$ (общий объем реакционной смеси) $\div 0,43$ (эффективность счета) $\div 0,8$ (тушение) $\cdot 4$ (изотопный эффект) $\div 0,05$ (выход) $= 1,86 \cdot 10^8$ расп./мин $^3\text{H}_2\text{O}$, которую необходимо добавить к реакционной смеси. Имеющаяся в продаже $^3\text{H}_2\text{O}$ содержит 25 мКи/мл или $25 \text{ мКи} \cdot 2,22 \cdot 10^9$ (расп./мин/мКи) $= 5,55 \times 10^{10}$ расп./мин/мл основного раствора: $\frac{1,86 \cdot 10^8}{5,55 \cdot 10^{10}} = 0,00335 \text{ мл}$ (3,35 мкл). Лучше взять 3,35 мл основного раствора $^3\text{H}_2\text{O}$ и развести его в 1000 раз.

Таким образом, подсчет общей радиоактивности дает информацию о необходимых количествах используемых веществ. Однако следует рассчитать также и удельную активность, т. е. число распадов в 1 мин на 1 моль или 1 мкмоль вещества, для того чтобы определить число участвующих в изотопном обмене атомов трития или выяснить, вовлечены ли в уравнивание с атомами водорода какие-то другие процессы. В приведенном выше примере было установлено, что в 1 мл или в 55,56 ммольях воды либо в 111 мэkv. водорода, содержащихся в 1 мл, происходит $5,55 \cdot 10^{10}$ расп./мин. Удельная активность равна $\frac{5,55 \cdot 10^{10}}{1,11 \cdot 10^3}$, или $5 \cdot 10^8$, расп./мин/мэkv. Н.

Находим коэффициент разбавления удельной активности при инкубировании 10 мл реакционной смеси: $\frac{10 \text{ мл}}{0,00335 \text{ мл } ^3\text{H}_2\text{O}} =$

$= 2,985$, что дает удельную активность $5 \cdot 10^8 / 2,985 = 1,67 \cdot 10^5$ расп./мин/мэкв. Н. Если выделенный метаболит имел такую удельную активность, то, значит, в него был включен 1 экв. $^3\text{H}^+$ при изотопном эффекте, равном 4. Если удельная радиоактивность выше или ниже этого значения, то величина изотопного эффекта должна быть другой, при этом в изотопном обмене могут участвовать атомы водорода не только из $^3\text{H}_2\text{O}$ (более низкая удельная активность) или в молекулу метаболита включается более чем один протон из $^3\text{H}_2\text{O}$ (более высокая удельная активность). У трития изотопный эффект имеет значительную величину, тогда как у ^{14}C , ^{32}P и ^{35}S он настолько низок, что его можно не принимать во внимание. Часто бывает необходимо проводить независимое определение изотопного эффекта, измеряя скорость реакции с H_2O (или $^2\text{H}_2\text{O}$) и с $^3\text{H}_2\text{O}$.

Исследование ферментов с помощью изотопов

Разработаны многочисленные методики определения ферментов с использованием радиоизотопов. В ряде случаев никаких других удобных способов просто не существует. Кроме того, методам с применением изотопов присуща высокая чувствительность, что необходимо для проведения многих видов исследований. Как отмечается в другом разделе данного руководства (разд. 18.2.2), количество фермента пропорционально скорости превращения субстрата или образования продукта. Следовательно, необходимо иметь данные об изменении концентрации субстрата или продукта в зависимости от времени. Для того чтобы анализ был достоверным, начальная скорость реакции должна быть постоянной в течение небольшого промежутка времени и пропорциональной содержанию фермента в исследуемой пробе. Некоторые приборы, такие, как спектрофотометры и рН-метры, позволяют непрерывно следить за скоростью реакции в одной анализируемой пробе, причем ход реакции часто регистрируется самописцем на бумажной ленте. Однако в других случаях, как, например, при исследовании ферментов с помощью радиоизотопов, скорость реакции можно определять лишь путем периодического измерения радиоактивности в отдельных аликвотах реакционной смеси.

Одна из основных трудностей, возникающих при проведении таких анализов, связана с необходимостью отделения радиоактивного субстрата от радиоактивных продуктов. Обычно меченый субстрат присутствует в количествах, необходимых для насыщения фермента, и, следовательно, реакция по своим кинетическим параметрам является реакцией псевдонулевого порядка, т. е. ее скорость остается постоянной в течение длительного промежутка времени. При использовании чувствительных и надежных методов анализа количество образующегося продукта может составлять лишь 1% количества присутствующего субстрата. Поэтому необходимо отделить небольшое количество радиоактивного продукта от очень большого количества радиоактивного субстрата. Успешное достижение этой цели зависит от того, будет ли найден эффективный метод разделения, который позволит получить препараты этих двух веществ, содержащие 0,1% или менее примеси другого вещества. Применяемые методы разделения часто специально предназначены для какого-либо конкретного случая, поэтому их описание не входит в нашу задачу. Мы дадим лишь краткий обзор общих методов разделения. В работе Олдхэма [54] они рассматриваются более подробно.

Существуют следующие методы разделения: 1) осаждение макромолекул, таких, как полинуклеотиды, полипептиды и полисахариды; 2) выделение или поглощение летучих меченых соединений, например $^3\text{H}_2\text{O}$, $^{14}\text{CO}_2$ или летучих жирных кислот, которые можно отделить от других веществ перегонкой или иным способом; 3) экстракция растворителем; 4) ионный обмен; 5) хроматография на бумаге или в тонком слое и электрофорез; 6) адсорбция и элюция; 7) выделение производных; 8) превращение немеченого продукта в меченое производное; 9) диализ и гель-фильтрация; 10) обратное изотопное разбавление.

Степень загрязнения продукта субстратом в процессе их выделения ограничивает чувствительность применяемого метода. Допустим, например, что примесь субстрата в продукте после их разделения составляет 0,1%. Допустим также, что скорость счета в нулевое время (т. е. когда продукт еще не образовался) равна 100 имп/мин, что объясняется наличием перекрестного

загрязнения. Желательно, чтобы скорость счета, обусловленная образовавшимся продуктом, по крайней мере равнялась скорости счета в нулевое время, т. е. составляла бы 100 имп/мин при 0,5%-ном превращении субстрата. В этом случае соотношение сигнала и фонового шума равно 1:1, что означает минимальную чувствительность при не слишком высоких скоростях счета (разд. 16.4.4). Чтобы получить указанную скорость счета, минимальная скорость счета для субстрата при анализе всего образца должна составлять 100 000 имп/мин. Более высокая радиоактивность не приведет к повышению чувствительности, так как соответственно возрастет и скорость счета в нулевое время. Конечно, повышение радиоактивности продукта до уровня, превосходящего скорость счета в нулевое время, уменьшит ошибку определения. Однако образование слишком больших количеств продукта нарушает необходимые для получения достоверных результатов условия, обеспечивающие псевдоулевым порядком реакции.

Из приведенного примера видно, что, хотя для насыщения фермента нужно добавлять достаточное количество субстрата, его радиоактивность не обязательно должна быть высокой. С другой стороны, если удалось полностью разделить между собой субстрат и продукт, чувствительность метода становится пропорциональной удельной активности субстрата и ограничивается только стоимостью, целесообразностью применения и доступностью этого субстрата. В этих условиях исследователи могут предпочесть субстраты, меченные ^3H , а не ^{14}C , так как за ту же цену они могут купить препарат, удельная активность которого в 100 раз выше (см. ниже о трудностях, связанных с применением ^3H).

Разбавление радиоактивного субстрата нерадиоактивным способствует насыщению фермента субстратом и создает ряд дополнительных преимуществ. В частности, оно дает возможность снизить 1) затраты на радиоактивный материал, так как позволяет использовать меньшее количество изотопа; 2) влияние примесей и продуктов радиационного распада в радиоактивных субстратах; 3) действие нежелательного стереоизомера в радиоактивном субстрате, состоящем из смеси изомеров, в результате добавления немеченого субстрата с нуж-

ной стереоконфигурацией; 4) радиационный распад субстрата. Такое разбавление повышает также точность определений.

Поскольку ферментативная активность выражается в международных единицах (МЕ) и 1 МЕ равна такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в стандартных условиях, скорость счета следует выражать в мкмоль/мин, используя удельную активность субстрата (который будет превращен в продукт предположительно с такой же удельной активностью). При определении удельной активности субстрата путем измерения радиоактивности и концентрации часто допускаются ошибки. Хотя удельная активность применяемого радиоизотопа обычно известна с точностью до $\pm 5\%$, этот препарат редко используется как таковой, чаще он разбавляется большими количествами нерадиоактивной формы, что приводит к соответствующим погрешностям в измерениях радиоактивности и в определении чистоты препарата. Поэтому рекомендуется точно определять удельную радиоактивность субстрата, используемого в экспериментах. Кроме того, может возникнуть необходимость проверки радиохимической чистоты субстрата или его предварительной очистки с целью удаления продуктов распада и других примесей.

*Особые трудности, встречающиеся
при работе с субстратами, мечеными тритием*

Тритий проявляет изотопный эффект по отношению к водороду, так как обладает намного большей массой, чем водород. Этот эффект наиболее сильно выражен тогда, когда образование или разрушение связи между тритием или водородом и каким-то другим атомом является этапом, лимитирующим скорость реакции. Изотопный эффект может возрасти до такой степени, что реакция с мечеными тритием соединениями практически не будет идти, как это наблюдается при карбоксилировании L-рибулозо-5-фосфата с участием $^3\text{H-NADH}$ -фосфата и CO_2 . Изотопный эффект может проявляться в виде изменений V_{max} или K_m фермента при использовании меченого тритием субстрата. Если

K_m снижается, эффект не будет наблюдаться при условии насыщения фермента субстратом. При повышении K_m скорость реакции будет снижаться, если концентрация субстрата оказывается недостаточной для насыщения фермента.

Следует помнить, что, когда тритий используется в качестве метки только для того, чтобы проследить превращение субстрата в продукт, ^3H (в отличие от ^{14}C) часто выделяется в среду в виде ионов $^3\text{H}^+$ в результате побочных спонтанных реакций, снижая тем самым удельную активность субстрата и продуктов и, следовательно, приводя к получению ошибочных данных о низкой ферментативной активности. В некоторых случаях побочные реакции катализируются ферментами и не всегда доходят до конца. Кроме того, для меченных тритием соединений характерна «утечка» $^3\text{H}^+$ в результате какой-нибудь химической реакции. Все зависит от положения ^3H в молекуле. Например, α - ^3H -аминокислоты теряют ^3H в ходе многих реакций, катализируемых ферментами, тогда как атомы ^3H , расположенные в других, особенно в отдаленных от функциональных групп, позициях, относительно устойчивы. Потеря трития может происходить также при выделении продукта.

Некоторые определения ферментов основаны на освобождении ^3H из специфического положения в субстрате. Результаты анализа могут быть ошибочными, если ^3H находится не только в предполагаемом месте и (или) принимает неправильное стереоположение, так как многократно показано, что ферменты активируют тритий избирательно или специфически лишь в одном из двух или более положений, занимаемых ^3H или H .

Низкая энергия ^3H -радиации приводит к низкой эффективности счета и потерям вследствие тушения и поглощения излучения твердыми материалами. Эти два последних фактора в свою очередь обуславливают еще большую неточность измерений или даже получение ошибочных данных о более низких, чем на самом деле, скоростях ферментативных реакций. Поэтому часто необходима высокая эффективность счета и внесение поправок на тушение, рассчитанных на основе многократных измерений.

16.4.3. Жидкостные сцинтилляционные счетчики

Хотя сцинтилляционные счетчики стоят довольно дорого, в настоящее время они широко используются наряду со счетчиком Гейгера или газовыми счетчиками для измерения радиоактивности ^3H , ^{14}C , ^{35}S и ^{32}P . Это объясняется тем, что при счете в них устраняется самопоглощение образца и обеспечивается высокая эффективность счета. К тому же в случае счета с помощью сцинтилляции образца приготовить довольно просто.

В сцинтилляционном счетчике регистрируется импульс света, возбуждаемый в флуоресцирующем веществе в результате акта радиоактивного распада. Этот импульс обнаруживается с помощью пары фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) и регистрируется. Два ФЭУ работают по схеме совпадений, благодаря чему в них происходит почти полное подавление «шумов». ФЭУ преобразует световые импульсы в импульсы напряжения, причем амплитуды последних строго пропорциональны интенсивности первых, а следовательно, и исходным энергиям возбуждающих сцинтилляцию частиц. Регулируя с помощью дискриминатора пороги амплитуд импульсов, можно просчитывать только те импульсы, которые попадают в «окно», — интервал, ограниченный задаваемой минимальной и максимальной энергией излучения. Таким образом, прибор можно настроить на 1) отсеивание многих фоновых импульсов с низкой энергией, 2) избирательный счет импульсов одного изотопа (одного класса амплитуд) или на 3) счет всех изотопов (всех амплитуд импульсов). В современных приборах такую настройку осуществляют одновременно в нескольких параллельных каналах анализатора.

Радиоактивное излучение преобразуется в сцинтилляцию с помощью молекул растворителя, которые возбуждаются под действием этого излучения, а затем передают энергию возбуждения флуоресцирующему соединению (флуорохрому, или собственно сцинтиллятору). Возбужденный флуорохром либо излучает импульс света с определенной длиной волны, либо передает энергию возбуждения вторичному флуорохрому, который в свою очередь излучает импульс света в более приемлемой для регистрации области спектра. 2,5-дифенилоксазол (PPO)

и 1,4-бис-2-(5-фенилоксазолил)бензол (РОРОР) и его диметильное производное — наиболее распространенные первичные и вторичные флуорохромы, называемые собственно сцинтилляторами. Они представляют собой неполярные вещества, которые для получения сцинтилляционного раствора обычно растворяют в неполярных растворителях, например в толуоле. Главный недостаток сцинтилляционного счета заключается в трудности введения в неполярный раствор водных образцов, содержащих полярные растворенные вещества. Кроме того, вода и полярные растворители снижают эффективность счета, т. е. они наряду с окрашенными соединениями тушат сцинтилляцию. В связи с этими трудностями разработаны различные сцинтилляционные смеси для полярных и неполярных веществ в растворе, для твердых веществ и т. п. (см. ниже). Кроме того, в счетчике может регистрироваться высокий фон из-за флуоресценции или фосфоресценции, индуцированной солнечным светом, для исчезновения которого иногда требуется несколько часов или дней. Источником ошибок и высокого фона может быть также хемолюминесценция. Уровень фона может повышаться из-за ^{40}K , содержащегося в стекле, из которого сделаны флаконы для счета. Вместе с тем некоторые вещества, например ТХУ, HClO_4 , вода, пиридин и окрашенные соединения, тушат сцинтилляцию.

Твердые вещества

В сцинтилляторе можно просчитывать небольшие кусочки бумаги или кусочки сорбента с тонкослойных пластинок. Основные трудности, которые при этом возникают, связаны с самопоглощением частиц, разной ориентацией образцов, неодинаковой солиubilизацией радиоактивного материала, а также с использованием внешнего стандарта для определения эффективности счета (см. ниже). Поскольку прямого способа определения самопоглощения не существует, можно определить лишь относительную радиоактивность ряда образцов в одинаковых условиях. Вариабельность в счете уменьшается, если радиоактивное вещество полностью растворяется или совершенно не растворяется в сцинтилляционном растворе. Например, для извлечения аминокислот и

сахаров из бумаги используют гидроксид гиамина 10-X в метаноле, а затем пробы просчитывают в толуоле. Если радиоактивное вещество нельзя полностью элюировать с бумаги, можно сжечь ее и измерять радиоактивность CO_2 в составе органического основания или карбоната натрия (или бария). При просчитывании кусочка бумаги, содержащего нерастворимую радиоактивную фракцию, наиболее воспроизводимые результаты получают в том случае, когда он лежит на дне флакона.

Большие преимущества имеет использование дисков и полосок из стекловолокна, поскольку при этом повышается эффективность счета: с тритием она равна 10% при воспроизводимости $\pm 5\%$, тогда как при использовании целлюлозных дисков она равна 2—8%. В случае более сильных источников излучения, например ^{14}C , воспроизводимость экспериментов и эффективность счета еще выше.

Полиакриламидные гели

Основной проблемой является быстрая солюбилизация геля. Лучше всего гель солюбилизировать путем разрушения поперечных сшивок, поскольку несшитые линейные полиакриламидные цепи легко растворяются в сцинтилляционной смеси. В качестве поперечно-сшивающего агента обычно используют N,N'-диаллилтартардиадид, который легко расщепляется иодной кислотой [56]. Ряд гелей, содержащих 7% (вес/объем) акриламида и 0,27% (вес/объем) поперечно-сшивающего агента, обрабатывают 0,5 мл 2%-ной иодной кислоты в течение 2 ч. Добавляют сцинтилляционную смесь, энергично перемешивают с помощью встряхивателя Vortex и используют для анализа весь раствор или отбирают из него аликвоты для счета. Сцинтилляционная смесь способствует растворению геля [55].

Двуокись углерода

Измерение радиоактивности ^{14}C в составе CO_2 играет важную роль при изучении метаболизма бактерий, а также при проведении многих прикладных работ, где требуется сжигание или расщепление углеродсодержа-

щих соединений. Для сцинтилляционного счета CO_2 улавливают либо органическим основанием, например гидроксидом гиамина 10-X, применом 81-R, этаноламин-этилендиамином или фенилэтиламином, либо гидроксидом бария или NaOH . Во всех этих случаях необходимы специальные емкости для основания. Основания с включенным CO_2 вносят в сцинтилляционный раствор и просчитывают в счетчике. Способы сжигания описаны в работе Джеффи [59].

Работа с прибором

Регистрация одного изотопа. Прежде всего необходимо настроить прибор. Цель настройки — добиться максимальной эффективности счета для данного изотопа при минимуме фона. Для каждого канала возможны два типа настройки: 1) с помощью регулирования верхнего и нижнего порогов дискриминатора и 2) с помощью регулирования напряжения ФЭУ и коэффициента усиления. При увеличении последних двух параметров амплитуда импульса увеличивается.

С помощью верхнего и нижнего порогов дискриминатора устанавливают нужный диапазон амплитуды импульсов. Амплитудный спектр импульсов, или энергетический спектр, β -излучения определяют путем регулирования верхнего и нижнего порогов дискриминатора с последующей их фиксацией. Затем просчитывают изотоп при возрастающих значениях нижнего и верхнего порогов дискриминатора, но при постоянной разнице между ними (ширина окна) 0—10, 10—20, 20—30 и т. д. Кривая, отражающая счет в средней точке окна по всему диапазону дискриминатора, представляет собой энергетический спектр изотопа (рис. 16.8). Каждый изотоп имеет характерное распределение амплитуды импульсов. Очевидно, пороги в каждом канале можно отрегулировать таким образом, чтобы через него проходили импульсы из определенной части энергетического спектра изотопа, а импульсам из другой части спектра доступ был бы закрыт. Нижний порог устанавливают в положение, при котором исключалась бы большая часть шума, а верхний — в положение, при котором проходят импульсы с максимальной амплитудой. Благодаря такой

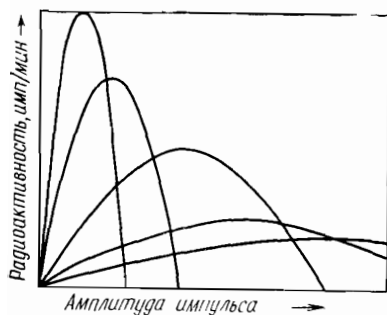
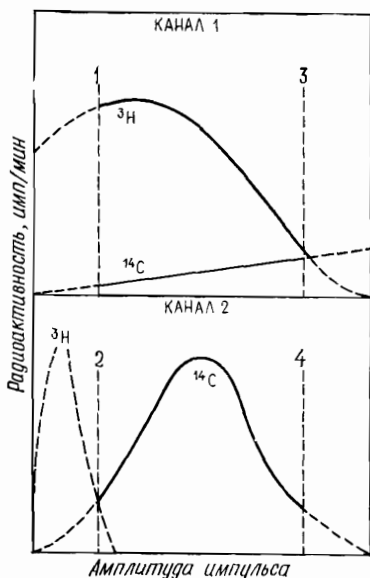


Рис. 16.8. Амплитудный спектр импульсов различных радиоизотопов.

Рис. 16.9. Амплитудный спектр импульсов как функция напряжения ФЭУ. 1, 2 — нижние пороги; 3, 4 — верхние пороги.



настройке исключается большая часть шумов с низкой и высокой энергией.

Определяя амплитудный спектр импульсов при различных напряжениях фотоумножителя, получают совокупность кривых (рис. 16.9), с помощью которых определяют отдельно радиоактивность каждого из двух изотопов в одном образце. При понижении напряжения интервал регулировки порогов дискриминаторов становится более узким.

Во всех случаях следует определять фон, т. е. радиоактивность в сцинтилляционном флаконе с пробой, не содержащей радиоактивный изотоп, которую вычитают из результата счета для каждого образца. При большой скорости счета фон не имеет существенного значения, однако при малой его необходимо учитывать.

Счет двойных меток. Счет двух радиоактивных изотопов в смеси возможен, если они имеют различную энергию, благодаря чему разделяются их амплитудные спектры импульсов. Такими парами являются ^3H и ^{14}C , ^3H и ^{35}S , ^3H и ^{32}P , ^{14}C и ^{32}P . Если изотоп с более высо-

кой энергией подсчитывается исключительно в канале 1, то в канал 2 для изотопа с низкой энергией могут попадать и импульсы изотопа с высокой энергией. Поэтому необходимо измерить эффективность счета для каждого изотопа отдельно, лучше всего с помощью внутренних и внешних стандартов, а затем определить счет в канале 2 с помощью уравнений:

$$\begin{aligned} \text{Расп /мин } ^{14}\text{C} &= \frac{\text{Счет в канале 1}}{\text{Эффективность счета } ^{14}\text{C в канале 1}}; \\ \text{Расп /мин } ^3\text{H} &= \\ &= \frac{(\text{Счет в канале 2}) - (\text{Расп /мин } ^{14}\text{C} \cdot \text{Эффективность счета } ^{14}\text{C в канале 2})}{\text{Эффективность счета } ^3\text{H в канале 2}}. \end{aligned}$$

Эффективность счета в канале 2 для изотопа с низкой энергией (в данном случае ^3H) можно оптимизировать регулированием порогов дискриминатора, используя стандарт, содержащий тритий. Затем нижний порог канала 1 устанавливают таким образом, чтобы он исключал импульсы ^3H , а верхний — так, чтобы он обеспечивал максимальную эффективность счета ^{14}C .

Применение этой методики целесообразно в том случае, если эффективность счета и тушение для образца соответствуют эффективности счета и тушению для используемого стандарта. При тушении большая часть импульсов с высокой энергией попадает в канал для низкой энергии. Исходное соотношение каналов, если оно известно по стандартам с подобным тушением, восстанавливают, изменяя положение порогов дискриминатора. Чтобы восстановить амплитудный спектр импульсов при исходной установке окна, можно также увеличить коэффициент усиления для ФЭУ или усилителя. Следует отметить, однако, что при низкой радиоактивности счет двойных меток сопряжен с трудностями и ошибками.

Эффективность счета и поправка на тушение. Даже лучшие сцинтилляционные счетчики в идеальных условиях не позволяют обнаружить все радиоактивные частицы, хотя для источников сильного β -излучения, например ^{14}C и ^{32}P , достигается эффективность счета выше 90%. Эффективность прибора можно определить не-

сколькими способами с использованием неполярной сцинтилляционной жидкости, не содержащей химических и физических агентов, вызывающих тушение. Чаще всего эффективность прибора и поправку на тушение определяют с помощью одного из трех методов, описанных ниже, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Метод внутренней стандартизации. Этот оригинальный метод относительно прост, надежен и точен при счете импульсов одной метки. Он требует поправки на тушение, обусловленное присутствием в смеси химических тушителей, в том числе окрашенных соединений. Сначала просчитывают рабочий образец (C), а затем к нему добавляют небольшое количество вещества с известной радиоактивностью (D_s) и той меткой, которую измеряют, например, для счета ^{14}C добавляют ^{14}C -бензойную кислоту, для счета ^3H — ^3H -толуол и т. д. и вновь просчитывают (C_t). Отсюда общая эффективность счета равна $(C_t - C)/D_s$, а радиоактивность образца равна

$$C \cdot \frac{D_s}{C_t - C}.$$

Метод внутренней стандартизации имеет ряд недостатков. Он довольно трудоемок, так как флаконы приходится извлекать из счетчика, добавлять в них стандарт и вновь просчитывать. После этого образец становится непригодным для повторного измерения. Метод также неудобен тем, что при добавлении стандарта во флакон необходима точная дозировка, которой достигают с помощью специальных автоматических пипеток или шприцев.

Метод отношения каналов. Этот метод основан на том, что амплитудный спектр импульсов в данной системе сцинтиллятор — изотоп при наличии тушения сдвигается. В счетчике с двумя каналами пороги в каждом регулируют отдельно, определяют счет в каждом канале и выражают его в виде отношения. Этот метод можно использовать и с одноканальным счетчиком, однако в этом случае необходимо производить счет дважды, перестраивая канал каждый раз по мере необходимости. Применяя стандарты с разным содержанием тушителя,

строят кривую зависимости эффективности счета от отношения счета в каналах и затем используют эту кривую в последующих расчетах. В обоих каналах нижний порог устанавливают таким образом, чтобы фиксировались импульсы с амплитудой, превышающей амплитуду фоновых импульсов. Один из порогов — верхний или нижний — может быть одинаковым для обоих каналов, а второй — различным. Можно настроить счетчик и так, чтобы и верхние и нижние пороги были различными для двух каналов. Поскольку тушение вызывается как бесцветными химическими веществами, например водой и CCl_4 , так и окрашенными, приготовление стандартов с таким же уровнем тушения, как и у неизвестного вещества, может оказаться трудным. Следовательно, если в образцах неизвестного состава присутствуют окрашенные соединения, вызывающие тушение, особенно в высоких концентрациях, неизбежна ошибка в приготовлении стандарта. Тем не менее данный метод применим в широком диапазоне условий [57]. Двухканальные системы требуют меньше времени для настройки, если только не приходится иметь дело с очень низкими скоростями счета. В последнем случае для получения отношения счетов заданной точности требуется намного больше времени, чем при использовании метода внутренней стандартизации. Применяя метод отношения каналов, образцы можно просчитывать повторно.

Метод внешней стандартизации. Новейшие приборы для измерения радиоактивности оснащены источником γ -излучения с известной радиоактивностью, который в нужный момент в соответствии с программой работы прибора устанавливают прямо под флаконом. Счет производят с источником γ -излучения и без него. Калибровочную кривую, отражающую зависимость счета для внешнего стандарта от эффективности счета (эффективность изменяют внесением тушителей), используют для коррекции счета в опытных образцах. Метод чувствителен к изменениям объема сцинтиллятора, толщины стеклянного флакона и природы сцинтиллятора. Ошибки могут возникать из-за неомогенности растворов или разного размера просчитываемых бумажных полосок. При низких уровнях радиоактивности длительный счет не требуется, как в методе отношения каналов. Метод

внешней стандартизации можно усовершенствовать, если сочетать его применение с принципом определения отношения каналов. В этом случае внешний стандарт считают в двух каналах, отрегулировав порог на амплитуду импульсов, превышающую амплитуду импульсов исследуемого изотопа, а затем определяют эффективность счета. Этот метод требует наличия четырех каналов или двукратного счета при различных значениях порогов.

Сцинтилляционные растворы

1. Для измерения радиоактивности в неполярных растворителях (минимальная температура -30°C):

2,5-Дифенилоксазол (РРО)	5 г/л
1,4-Бис-2-(5-фенилоксазолил) бензол (РОРОР)	0,3 г/л
Толуол	

Очень высокая эффективность счета (90—95%). Можно использовать для счета бумажных фильтров в форме дисков (Millipore Corp.), если они сухие. Погруженные в толуол диски должны быть прозрачными; если они белые, то это означает, что высушивание было неполным.

2. Для измерения радиоактивности в гомогенных растворах или эмульсиях (в зависимости от количества воды: в присутствии 4—14% воды образуются растворы, 20—30% воды — эмульсии) [61, 62]:

Толуол (667 мл), содержащий 0,4% РРО (2,67 г) и 0,1% РОРОР (0,07 г)

Тритон X-100 (Rohm and Haas Co., Philadelphia Pa.) 333 мл

Эффективность счета для ^{14}C — 52—68%, для ^3H — 7—10%, однако она варьирует в зависимости от партии тритона X-100.

3. Для измерения радиоактивности в устойчивых гелях с высоким содержанием воды [в присутствии $\sim 35\%$ воды образуются эмульсии, при низкой температуре образуются устойчивые гели (до -5°C), которые при нагревании разжижаются] [61]:

Толуол (538 мл), содержащий 0,4% РРО (2,1 г) и 0,1% РОРОР (0,05 г)

Тритон X-100 462 мл

Эффективность счета для ^{14}C — 43—55% в присутствии 43% воды. Использование трития рекомендуется только в том случае, если измеряют радиоактивность геля. Эффективность счета для ^3H равна $\sim 5\%$. Полезен при применении с суспензиями тканей, порош-

ками, например карбонатом бария и другими материалами белого цвета.

4. Для измерения радиоактивности в гомогенных растворах с содержанием воды до 33% [58]:

Тритон X-100	257 мл
Этиленгликоль	37 мл
Этанол	106 мл
Ксилол	500 мл (до конечного объема 1 л)
PPO	3 г (PPOP не используют)

Эффективность счета без тушения — 87% для ^{14}C и 47% для ^3H . При максимальном количестве воды — 82% для ^{14}C и 35% для ^3H . Зависимость между эффективностью счета и отношением внешнего стандарта (см. ниже) имеет линейный характер.

5. Для измерения радиоактивности в солюбилизированных полиакриламидных гелях:

Тритон X-115 (Rohm and Haas Co.)	250 мл
Ксилол	750 мл
PPO	3 г (PPOP не требуется)

Максимальная эффективность счета — 93% для ^{14}C и 47% для ^3H . В присутствии 30% воды эффективность счета снижается до 50—60% для ^{14}C и 10% для ^3H . При промежуточных значениях концентрации воды образуется устойчивая эмульсия

6. Для измерения радиоактивности в CO_2 [60]:

Этаноламин	1 часть
Монометилловый эфир этиленгликоля	8 частей
Толуол	10 частей
PPO	5 г/л

16.4.4. Статистика счета [52, 53]

При определении радиоактивности по измерению счета и времени даже в идеальных условиях не исключены случайные ошибки, которые могут привести к неправильным результатам. Поэтому необходимо располагать статистическим способом определения ошибки. Для правильного его применения можно не знать, как получают конечные выражения, но необходимо знать принятые допущения и терминологию статистики счета. В нашу задачу не входит ни обсуждение применения этого способа, ни приведение соответствующих примеров, так как для этого потребовалось бы множество таблиц и графиков. Тем, кого интересует более подробная информация, мы рекомендуем обратиться к списку литературы в конце данной главы. Однако мы перечислим некоторые важ-

ные способы статистической обработки и приведем соответствующие уравнения. К ним относятся способы определения среднего значения счета, стандартного отклонения для единичного и многократного счета, стандартной ошибки счета и скорости счета в процентах (% SE), а также времени счета, необходимого для получения результатов с данной стандартной ошибкой при наличии фона и без него с одинаковыми и различными временами счета фона и образца. Существуют также уравнения и таблицы для определения времени счета фона, а также общего счета с определенной стандартной ошибкой. Эти уравнения и таблицы позволяют устанавливать пределы обнаружения радиоактивности и выбирать правильный способ устранения тех значений счета, которые сильно отклоняются от среднего.

Существуют различные виды ошибок: например, если истинное значение лежит в пределах измеренного в 50% случаев, то такую ошибку называют вероятной; если в 68% случаев, то ее называют стандартной (средней квадратичной) ошибкой, а если в 99—100%, то 99%-ной. Поскольку коэффициент стандартной ошибки во многих статистических расчетах = 1 и это значение используется чаще всего, мы рассмотрим здесь только «стандартные» формы уравнений. Это означает, что любое из ряда полученных значений не отличается от среднего значения более чем на стандартное отклонение в 32% случаев. Поскольку ошибки счета постоянны во времени, можно определить число просчитанных импульсов, необходимых для получения результатов с данной стандартной ошибкой, используя приведенные ниже выражения. Например, для стандартной ошибки в 1% требуется просчитать 10 000 имп, для 2,5%—1600, для 5%—400, а для 10%—100. Как видно из выражений, представленных ниже, при стандартной ошибке 1% для счета фона потребуется 840 мин, а для счета образца и фона 1140 мин, тогда как при стандартной ошибке 10% эти цифры равны соответственно 8 и 11 мин.

Статистические формулы

1. Среднее значение для нескольких измерений:

$$\bar{X} = \frac{\text{Сумма импульсов отдельных измерений (X)}}{\text{Количество измерений (n)}} .$$

2. Стандартное отклонение при нескольких циклах измерений:

$$SD = \left(\frac{(\text{Сумма отклонений } X \text{ от } \bar{X})^2}{n - 1} \right)^{1/2}.$$

3. Стандартная ошибка скорости счета SE (%) равна

$$SE = \frac{100}{\text{Скорость счета } (R) \cdot \text{Время } (t)^{1/2}}.$$

4. Время, необходимое для получения результатов с данной стандартной ошибкой SE (%):

$$t = \frac{10^4}{R(SE\%)^2}.$$

5. Стандартная ошибка счета образца, когда время на счета образца и фона одинаковы:

$$SE(\%) = \frac{100(X_{\text{сумм}} - X_{\text{фон}})^{1/2}}{X_{\text{сумм}} - X_{\text{фон}}}.$$

6. Стандартная ошибка счета образца без счета фона, когда времена счета фона и образца не одинаковы:

$$SE(\%) = \frac{200(R_t/t + R_b/t_b)^{1/2}}{R_t - R_b},$$

где R_t и R_b — суммарная скорость счета и скорость счета фона соответственно, а t_t и t_b — времена для R_t и R_b .

16.5. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

16.5.1. Диск-электрофорез в геле

Диск-электрофорез в его многочисленных вариантах, позволяющий проводить разделение макромолекул, стал в настоящее время очень важным методом, применяемым в биологических и медицинских исследованиях, а также в клинической диагностике и промышленности (для контроля за технологическими процессами). С тех пор как в 1959 г. Орнштейн [67] и Дэвис [64] впервые описали метод «прерывистого» электрофореза, проводится широкое изучение всех аспектов гель-электрофореза, в результате чего был внесен большой вклад в разработку теории этого метода, получена подробная информация

об условиях его применения на практике, а также описано множество систем буферов и гелей [66]. Здесь будет рассмотрена лишь одна из основных широко распространенных систем наряду с условиями ее использования, необходимыми для получения хороших результатов. Описаны также некоторые из главных областей применения диск-электрофореза.

Общие сведения

Электрофорез проводят либо в цилиндрических колонках, заполненных гелем (в стеклянных трубках), либо на пластинках размерами 10×10 см, покрытых слоем геля толщиной 1—4 мм. Гель состоит из трех слоев: внизу располагается разделяющий гель, в середине — концентрирующий (гель-прокладка) и сверху — стартовый гель, содержащий образец. Каждый слой представляет собой полиакриламид с определенной степенью сшивки. Гель образуется в трубке или на пластинке из раствора, содержащего акриламид (мономер), N,N'-метиленбисакриламид (БИС), буфер, сшивающий и полимеризующий агенты. Полимеризацию катализируют либо химическим способом, используя персульфат аммония, либо фотохимическим — с помощью света, который вызывает образование свободных радикалов в присутствии кислорода.

Разделение белков в прерывистой системе зависит от двух основных факторов: 1) различий в подвижности белков, обусловленных присущим поперечно-сшитым гелям молекулярно-ситовым эффектом, обеспечивающим разделение молекул в соответствии с их размерами, и 2) различий, связанных с зарядом молекул. Кроме того, необычно четкие зоны образуются благодаря концентрированию белков в виде очень узкой полосы или диска перед вхождением их в разделяющий гель. Таким образом, величина молекулярно-ситового эффекта зависит от степени поперечной сшивки, которая в свою очередь определяется концентрацией сшивающего акриламида. Концентрирование белков в виде узкой полосы, перед тем как они входят в разделяющий гель, характерно для прерывистого электрофореза. Оно происходит в результате искусного использования неоднородного («преры-

вистого») ионного состава буферных растворов с разными значениями pH, а также неоднородных гелей с различными размерами пор во время прохождения белков через три слоя геля. Концентрирование белков обеспечивают, подбирая буферные растворы, содержащие такую пару ионов и имеющие такие значения pH, чтобы подвижность одного иона (Cl^-), умноженная на степень его диссоциации, была больше произведения тех же величин для белка. В свою очередь это произведение должно быть больше, чем соответствующая величина для второго иона (глицина) [66]. Для выполнения этих условий на более длинный разделяющий гель с мелкими порами наслаивают концентрирующий гель с низкой степенью сшивки. Поверх концентрирующего геля помещают крупнопористый стартовый гель, содержащий образец (рис. 16.10). Разделяющий гель готовят на более щелочном буфере с pH 8,9, тогда как концентрирующий и стартовый гели содержат буфер с pH 8,3. При наложении электрического поля белки быстро пересекают концентрирующий гель и образуют очень узкую полосу над разделяющим гелем, заключенную между хлорид- и глицинат-ионами. Затем белки медленно проникают в разделяющий гель. Скорость их перемещения в разделяющем геле зависит от заряда (обусловленного pH) и размеров молекул (благодаря тому, что гель имеет поры с фиксированными размерами и определенную степень поперечной сшивки). Поскольку перед разделением белков они концентрируются в очень узкой зоне, достигается чрезвычайно высокое разрешение. Например, сыворотка крови разделяется на 15—20 зон. Сообщалось о разделении 62 компонентов сыворотки с помощью усовершенствованной системы для прерывистого электрофореза [81]. После окончания электрофореза гель можно анализировать путем сканирования в УФ-свете, не извлекая его из пробирки. Можно также проводить анализ с помощью УФ-сканирования или окрашивания после извлечения геля из пробирки. Согласно другому методу, гель разрезают на сегменты, которые затем вымачивают в растворе для элюирования содержащихся в них компонентов анализируемой смеси. Кроме того, при использовании меченых изотопов гели можно солибилизовать и определить в них радиоактивность. Можно также

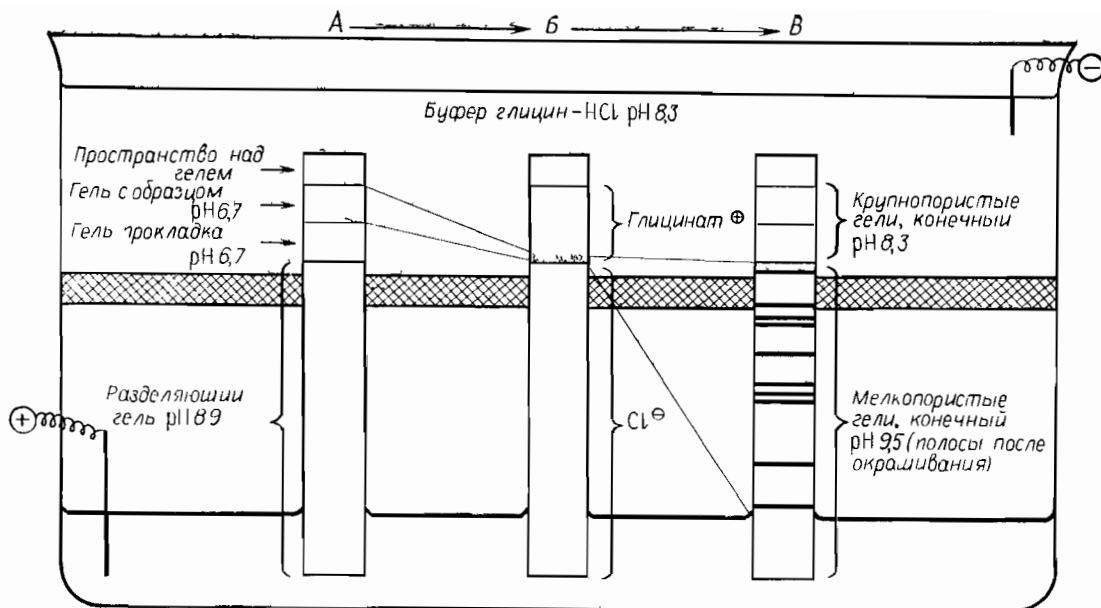


Рис. 16.10. Слои геля и поведение ионов при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле. А. Образец в геле. Б. Образец, сконцентрированный на границе раздела между гелем-прокладкой и разделяющим гелем. В. Образец, разделенный на полосы в конце процесса.

разрезать гель в продольном направлении и после высушивания проанализировать его методом радиоавтографии.

Колоночный метод [66]

Для проведения электрофореза в колонках требуется очень простое оборудование, которое можно приобрести в готовом виде или изготовить в лаборатории. В него входит водонепроницаемый держатель для одной или более стеклянных трубок длиной 65—70 мм и внутренним диаметром 5 мм. Конструкция системы такова, что наверху находятся буфер и электрод (катод), контактирующие с трубкой, заполненной гелем, а внизу находится такой же буфер и анод (рис. 16.11). Трубки должны быть одного диаметра и иметь ровные края. Такие трубки можно изготовить в лаборатории или стеклодувной мастерской. Они должны быть тщательно вымыты, перед сушкой их можно окунуть в неионный детергент (например, Kodak Photo-Flo).

Первоначальная процедура заполнения трубок акриламидом, описанная Орнстейном [67] и Дэвисом [64], начиналась с полимеризации разделяющего геля в нижней части трубки. Позже была предложена методика [66], по которой разделяющий гель полимеризуется в верхней части трубки, так как при этом образуется более однородная граница раздела между концентрирующим и разделяющим гелями. Заполнение трубки проводят следующим образом. В резиновый колпачок наливают 0,2 мл 40%-ного раствора сахарозы и плотно прижимают трубку к дну колпачка, для того чтобы предотвратить образование пузырьков воздуха. Трубку устанавливают в вертикальное положение; затем готовят около 0,15 мл смеси для получения концентрирующего геля (см. ниже) и с помощью небольшого шприца с иглой (длина 8 см, внутренний диаметр 0,6—0,8 мм) насаивают эту смесь на раствор сахарозы. На поверхность концентрирующего геля осторожно наливают немного воды так, чтобы не произошло перемешивания этих двух слоев и между ними образовалась резкая граница. Высокое разрешение достигается в основном благодаря образованию четкой ровной границы между

концентрирующим и разделяющим гелями. Полимеризацию геля вызывают облучением его флуоресцентной лампой в течение 20—30 мин с расстояния 2—3 см. После полимеризации слой воды осторожно и тщательно удаляют шприцем, а затем тампоном из неворсистого материала.

Далее готовят разделяющий гель. Поверхность концентрирующего геля дважды быстро промывают смесью для получения разделяющего геля, а затем с помощью шприца заполняют трубку этой смесью так, чтобы получился выпуклый мениск, стараясь избежать образования пузырьков воздуха. Затем конец трубки плотно заклеивают полимерной пленкой. Всю эту процедуру необходимо провести в течение 5 мин после образования концентрирующего геля. Как только полимеризация закончится (через 30—40 мин), осторожно снимают колпачок, переворачивают трубку и аккуратно вставляют ее в резиновый колпачок нижним концом. Из другого конца, ставшего теперь верхним, удаляют раствор сахарозы и промывают поверхность концентрирующего геля смесью такого же состава. Затем наносят образец, включенный в смесь для приготовления стартового геля, и осторожно наливают электродный буфер до верхнего края трубки, не допуская перемешивания двух слоев.

После этого проводят фотолиз стартового геля, как описано выше. Всю эту процедуру можно легко про-

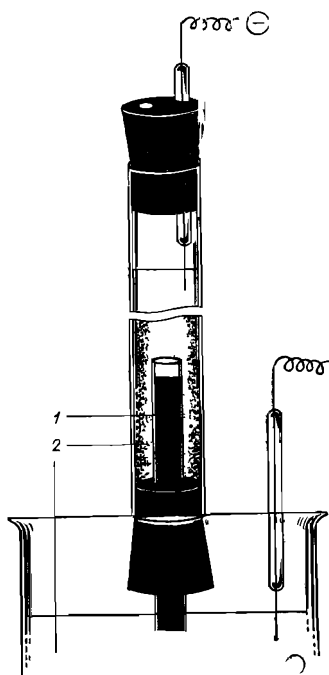


Рис. 16.11. Простой прибор для электрофореза на колонке 1 — агаровый гель, 2 — буферный раствор

вести сразу в нескольких трубках, если заранее приготовить все необходимые растворы и если флуоресцентная лампа имеет достаточную длину.

Трубки помещают в прибор и осторожно добавляют предварительно охлажденный электродный буфер в пространство сверху и снизу трубок (высота слоя нижнего буфера должна быть не меньше 4 см). Верхний буфер содержит бромтимоловый синий, для того чтобы можно было следить за перемещением границы. Затем подключают источник питания так, чтобы анод (положительный конец) был внизу. В течение первых 2 мин сила тока должна составлять 1 мА на 1 трубку, а затем 2—5 мА на 1 трубку до тех пор, пока окрашенная полоса не окажется на расстоянии около 1 см от нижнего конца трубки.

При падении напряжения в процессе электрофореза выделяется тепло, пропорциональное силе тока. Избыточное тепло приводит к образованию неровных полос. Если в начале электрофореза температура системы была 20°C, то через 40 мин она повышается до 30—40°C. Температуру можно снизить, уменьшив силу тока, например, до 1 мА/гель при большей продолжительности электрофореза (140 мин). Однако в этом случае происходит некоторое расширение полос за счет диффузии. Можно также проводить электрофорез при 4°C, даже перемешивая при этом нижний электродный буфер.

Разделяющие гели можно хранить в течение нескольких дней, но после добавления концентрирующего геля и исследуемого образца в стартовом геле электрофорез следует начать не позже, чем через 1 ч. Электродные буферы можно использовать многократно, но анодный и катодный буферы необходимо хранить отдельно. После нескольких анализов или при изменении рН приготавливают свежие буферные растворы. Гели анализируют либо непосредственно в трубках, либо после извлечения из них.

Поскольку во время электрофореза проводимость геля изменяется, следует ожидать, что напряжение и ток также будут изменяться. Рекомендуется применять регулируемый источник тока, позволяющий поддерживать постоянную силу тока в течение всего процесса разделения.

Если число трубок с гелем, подвергаемых одновременному электрофорезу, равно n , то сила тока должна в n раз превышать ее значение, выбранное для одной трубки; при этом во всех трубках должна быть одинаковая сила тока. Это условие выполняется только в том случае, если площадь поперечного сечения и состав всех столбиков геля одинаковы.

Электрофорез на пластинах

Электрофоретическое разделение исследуемых веществ можно также осуществлять на пластинах полиакриламидного геля размерами 100×100 мм при толщине слоя геля от 1 до 3,5 мм. Пластины с углублениями для внесения образцов приготавливают на особых подставках. Для проведения электрофореза требуется специальное оборудование. Конструкция прибора позволяет устанавливать пластины в вертикальное положение; при этом канавки для образцов должны быть расположены у верхнего края пластины и контактировать с верхним буфером, тогда как противоположный край пластины должен находиться в контакте с нижним буфером. Необходимо обеспечить циркуляцию охлаждающей жидкости по поверхности пластины с обеих ее сторон. Основное достоинство этой системы заключается в том, что она позволяет проводить одновременное разделение нескольких образцов в одинаковых условиях, благодаря чему их легко можно сравнивать между собой. Считается, что пластины легче анализировать с помощью денситометра, однако для этого необходимо иметь специальный прибор. Кроме того, пластинки можно без особого труда разрезать на полоски и проанализировать их на наличие различных компонентов путем окрашивания или определения радиоактивности. Полоски можно также высушивать и хранить. Однако для приготовления пластин требуется больше акриламида, особенно если анализируется немного образцов. Как и в случае электрофореза в трубках, для данного метода разработан целый ряд однородных и неоднородных («прерывистых») буферных систем. Здесь применяются те же способы приготовления гелей, методики разделения и анализа, что и при электрофорезе в трубках.

Приготовление гелей

Рассмотрим подробно приготовление одной из наиболее распространенных систем неоднородных («прерывистых») гелей. Описание многих других систем содержится в книге Мауэра [66]. Вследствие токсичности акриламида следует избегать вдыхания его распыленных частиц и попадания его на кожу.

Концентрирующий и стартовый гели:

- 1 часть раствора А (25,6 мл H_3PO_4 + 5,7 г триса на 100 мл)
- 2 части раствора Б (10 г акриламида + 2,5 г N,N'-метиленбисакриламида (БИС) на 100 мл)
- 1 часть раствора В (4 мг рибофлавина на 100 мл)
- 4 части раствора Г (40%-ный раствор сахарозы).

Разделяющий гель:

- 1 часть раствора Д (48 мл 1 н. HCl + 36,6 г триса + 0,23 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД) на 100 мл)
- 2 части раствора Е (30 г акриламида + 0,8 г БИС на 100 мл)
- 1 часть воды
- 4 части раствора Ж (0,14 г персульфата аммония на 100 мл).

Использование персульфата для полимеризации позволяет получать гели с различной пористостью и электрофоретическими свойствами. Поэтому важно, чтобы полимеризация проходила при стандартных условиях. Персульфат может вызывать артефакты, которых легко избежать, если заменить персульфат рибофлавином и использовать фотолитическую полимеризацию вместо химической или применять восстанавливающие агенты, например тиогликолат (0,01—0,001 часть на 1 часть глицина в буфере). С той же целью можно добавлять меркаптоэтанол (5 мМ) в концентрирующий и стартовый гели и в верхний буфер. Для удаления персульфата и других примесей иногда проводят предварительный электрофорез, но это нарушает прерывистость электрофоретической системы, превращая ее в однородную систему, что не всегда позволяет достичь нужного разрешения.

При электрофорезе белков в состав геля можно включать ряд диссоциирующих агентов, например додецилсульфат натрия (см. ниже), дезоксихолат, тритон X-100 и мочевины.

Электродные буферы

0,6 г триса, 2,28 г глицина, 2 мл 0,001%-ного отфильтрованного раствора бромтимолового синего (только для верхнего буфера), рН 8,3.

В литературе описано много общих и специальных буферных систем, которые можно успешно использовать в качестве электродных буферов [66].

Чистота акриламида и БИС играет важную роль в достижении хороших результатов, особенно при сканировании в УФ-свете белков и нуклеиновых кислот (см. ниже). Реактивы высокой степени чистоты имеются в продаже, или их можно приготовить в лаборатории [66].

Проба

Проба должна по возможности иметь такой же состав буфера, рН и ионную силу, как и концентрирующий гель. Следует избегать применения растворов с высокой ионной силой.

Если при разделении получается небольшое количество полос, то вполне достаточно, чтобы проба содержала от 5 до 50 мкг белка на 1 гель; полоса, содержащая 1 мкг белка, хорошо видна после окрашивания кумасси ярким синим. Необходимо следить за тем, чтобы часть образца не перешла в электродный буфер.

Анализ гелей

Прямое денситометрическое определение. Анализируя результаты разделения белков и нуклеиновых кислот, часто упускают из вида возможность прямого сканирования гелей с помощью спектрофотометров. Этот метод отличается быстротой, позволяет проводить в процессе электрофореза повторное сканирование гелей через определенные промежутки времени для получения данных об электрофоретической подвижности исследуемых веществ и дает возможность избежать повреждения гелей при извлечении их из трубок. Недостатки метода заключаются в том, что его чувствительность (по отношению к белкам) в 2—3 раза ниже по сравнению с методом окрашивания, а также в том, что он требует

применения пропускающих УФ-свет трубок, чистых реактивов и точной настройки оптической системы, предназначенной для сканирования круглых на поперечном срезе цилиндрических гелей. Недорогие пропускающие УФ-свет трубки легко изготовить, нарезав алмазной пилой обычные трубки типа «Vycor» (Corning Glass Works) с внутренним диаметром 5 мм на отрезки нужной длины. Отбирают трубки с одинаковыми оптическими характеристиками, рассматривая их на свет. Проблема оптической настройки для сканирования цилиндрических гелей одинакова в отношении как окрашенных, так и неокрашенных гелей. Существует несколько денситометров, обеспечивающих оптимальное сканирование таких гелей.

Анализ гелей после извлечения их из трубок. Извлеченные из трубок гели можно сканировать, не подвергая их никакой дальнейшей обработке или после окрашивания. Окрашенные гели можно также разрезать на сегменты и проанализировать материал, полученный путем элюирования. Кроме того, гели можно солублировать, например для определения в них радиоактивности. Гели извлекают из трубок и окрашивают сразу же после электрофореза во избежание диффузии полос. Извлечение гелей связано с трудностями, и для того, чтобы успешно провести эту процедуру, не повредив поверхности гелей, необходим определенный опыт. Один из возможных способов заключается в том, что в пространство между стенкой трубки и гелем медленно вводят вращательным движением иглу шприца длиной около 8 см, выдавливая из шприца воду или 50%-ный глицерин. Иглу вынимают после того, как гель начинает свободно перемещаться в трубке или когда его можно вытеснить под давлением с помощью медицинской капельницы с грушей, заполненной водой. Это следует делать над лотком с водой или в самом лотке.

Окрашивание. В большинстве случаев перед анализом гели окрашивают. При разделении белков обычно применяют амидовый черный 10В, процион яркий синий RS и кумасси яркий синий R250 (последний обладает особенно большой чувствительностью). В продаже имеется много других красителей [66] для белков, дезоксирибо- и рибонуклеиновых кислот. В литературе можно

найти описание всевозможных вариантов окрашивания и различных усовершенствований. Сообщается, что процион яркий синий дает более воспроизводимые результаты, чем кумасси яркий синий, при количественном анализе гелей с помощью денситометра [66].

Для удаления из гелей додецилсульфата натрия, содержащегося в концентрации до 0,1%, гели перед окрашиванием промывают несколько раз смесью 10%-ной (вес/объем) трихлоруксусной кислоты и 33%-ного (объем/объем) водного раствора метанола.

Приготовление раствора красителя для белков. К 1 части 0,2%-ного водного раствора (вес/объем) кумасси яркого синего G250 добавляют 1 часть 2 н. H_2SO_4 и оставляют на 3 ч. Осадок удаляют фильтрованием через хроматографическую бумагу Whatman № 1 и к раствору добавляют $\frac{1}{9}$ объема 10 н. КОН. Затем приливают 100%-ную ТХУ до конечной концентрации 12% (вес/объем).

Гели помещают в раствор красителя на 5—8 ч. Окрашенные гели хранят в воде для достижения большей чувствительности. При хранении в кислотах интенсивность полос снижается. Этот метод позволяет получать линейные показания денситометра для белков (сывороточного альбумина) в интервале от 1 до 20 мкг.

Обесцвечивание. При окрашивании гелей по описанной выше методике фон остается прозрачным и не требует обесцвечивания. Однако во многих случаях после окрашивания необходимо проводить обесцвечивание фона. Это можно делать либо с помощью электрофореза, либо путем выщелачивания избытка красителя. Электрофоретическое обесцвечивание возможно в том случае, если краситель прочно связывается с белком, иначе некоторые полосы могут исчезнуть. Кроме того, для этих целей необходимо специальное приспособление. Тем не менее этот способ отличается быстротой и дает более светлый фон.

Для выщелачивания избытка красителя гели просто погружают на несколько часов в растворитель для красителя, обычно в уксусную кислоту.

Регистрация результатов и расчеты. Результаты разделения можно зарегистрировать самым простым способом, сделав схематические изображения окрашенных

гелей. Более точные количественные измерения производят на основе: 1) фотографий окрашенных гелей и последующего денситометрического сканирования негатива; 2) оптического сканирования окрашенных или неокрашенных гелей (280 нм) с регистрацией оптической плотности по длине геля с помощью самописца; 3) элюирования и анализа небольших сегментов (толщиной 1 мм), полученных при разрезании цилиндрических гелей, или разжижения гелей и разделения их на фракции. Для выявления ферментов часто используют следующую методику: сразу после электрофореза гель помещают в реакционную смесь, содержащую субстрат исследуемого фермента и какую-либо систему, обеспечивающую образование окрашенного продукта. После инкубирования геля в течение нескольких минут в нем появляется окрашенная зона, расположенная в том месте, где диффундирующие реагенты входят в контакт с ферментом. Если же реагенты не диффундируют в гель, то в результате реакции, происходящей на поверхности геля в зоне фермента, образуется кольцо.

Молекулярная масса нативных белков

Для определения молекулярной массы олигомерных белков широко применяется метод Хедрика и Смита [74], поскольку гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (в том варианте, который описан ниже) обычно приводит к диссоциации таких белков на мономеры с конформацией статистического клубка. Чтобы применить этот метод к нативным белкам, необходимо построить график зависимости $\lg R_m$ (логарифм отношения расстояния, на которое мигрировал данный белок, к расстоянию от старта до фронта красителя) от концентрации геля для каждого исследуемого и стандартного белка. С этой целью проводят электрофорез при нескольких концентрациях геля, т. е. при различной степени сшивки (рис. 16.12, А). В результате получают ряд прямых с разными углами наклона. Зависимость тангенсов этих углов от молекулярных масс соответствующих белков также носит линейный характер. Для отражения этой зависимости строят второй график, используя стандартные белки с известными молекуляр-

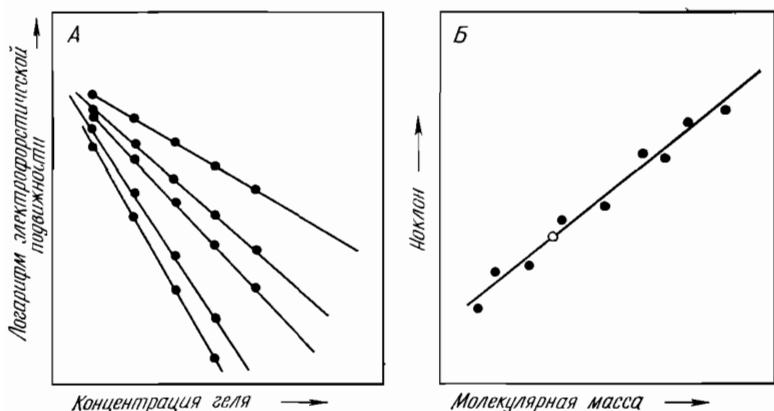


Рис. 16.12. А. Зависимость относительной подвижности (R_m) от степени поперечной сшивки (концентрации геля) для нескольких стандартных белков. Б. Зависимость наклонов прямых, представленных на рис. А, от молекулярных масс стандартных белков. Светлые кружки соответствуют неизвестному белку.

ными массами. Затем для неизвестного белка откладывают значения логарифма R_m против значений концентрации геля. По величине наклона полученной прямой на втором калибровочном графике находят молекулярную массу неизвестного белка.

Методика. Приготовление геля и электрофорез проводят в основном так, как описано выше в разделе, посвященном общим сведениям о геле-электрофорезе. Единственное различие состоит в том, что образец, разбавленный растворителем (см. ниже) в соотношении 1:1, осторожно наслаивают между концентрирующим гелем и буфером. После электрофореза фронт растворителя отмечают, вводя на этом уровне в столбик геля медную проволоку (№ 32). Гели окрашивают, как описано выше. Затем определяют значение R_m для каждого геля и строят график зависимости $\lg R_m$ от концентрации геля (по меньшей мере для четырех концентраций). Наклоны полученных прямых для исследуемых и стандартных белков откладывают против молекулярной массы каждого из них (рис. 16.12, Б). Молекулярную массу неизвестных белков определяют по калибровочному графику зависимости наклона — молекулярная масса.

Разделяющий 6%-ный гель, рН 7,9:

5 частей раствора А (трис-НСI, 0,48 М по Cl⁻ плюс 0,46 мл. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД) на 100 мл раствора, рН 7,9).

10 частей раствора Б (24 г акриламида и 0,8 г БИС на 100 мл).
5 частей воды.

Необходимая для этой работы концентрация геля варьирует от 3 до 15%. Гели готовят, разбавляя концентрированный раствор Б до нужной концентрации (в приведенном выше примере до 6%). 3%-ный гель содержит 12 г акриламида и 0,4 г БИС на 100 мл раствора.

Концентрирующий гель, рН 5,7:

2 части раствора В (имидазол-НСI, 0,48 М по Cl⁻, рН 5,7)

2 части раствора Д (4 мг рибофлавина на 100 мл)

4 части раствора Г (10 г акриламида и 2,5 г БИС на 100 мл)

8 частей воды.

Растворитель для образца, рН 5,7:

Имидазол-НСI, 0,06 М по Cl⁻ в 50%-ном глицерине.

Электродный буфер:

0,034 М аспарагин и 5·10⁻⁵%-ный раствор бромтимолового синего, доведенный трисом до рН 7,3

Молекулярная масса денатурированных мономерных белков или субъединиц олигомерных белков

Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) позволяет снизить до минимума влияние зарядов белков на их подвижность, которая в этих условиях зависит только от размеров молекул. Под действием ДСН третичная и вторичная структуры белков разрушаются. Для определения молекулярной массы очищенных белков, а также мембран, рибосом и т. д. широко используется метод Вебера и Осборна [80]. ДСН высвобождает и солюбилизирует компоненты этих структур, которые невозможно растворить никаким иным способом. В этом методе используется только одна концентрация геля, и график зависимости относительной подвижности (отношение расстояния, пройденного фронтом красителя, к расстоянию, пройденному зоной белка) от логарифма молекулярной массы имеет линейный харак-

тер в довольно широком диапазоне значений молекулярных масс. Таким образом, молекулярную массу неизвестного белка можно определить по графику, построенному на основании данных для белков с известными молекулярными массами (рис. 16.12, Б). При данной концентрации геля, например 10%, график будет линейным в диапазоне молекулярных масс от 10 000 до 100 000 [71]. Для других концентраций геля этот диапазон может быть шире или уже.

Методика. Разделяющий гель, содержащий ДСН, готовят так, как это описано выше для электрофореза в неоднородной («прерывистой») системе. Однако в данном случае концентрирующий гель не используется и образец наслаивают непосредственно на поверхность разделяющего геля.

Растворы белков (0,2—0,6 мг/мл) инкубируют при 37 °С в течение 2 ч в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 1% ДСН и 1% β-меркаптоэтанола. Для полного разворачивания полипептидных цепей и диссоциации белковых субъединиц иногда необходимо прокипятить раствор, добавить к нему мочевины до концентрации 8 М и (или) восстановить и карбоксиметилировать тиоловые группы [70]. Во многих случаях раствор можно использовать непосредственно без всякой обработки, но, если проведению электрофореза мешают соли, образец диализуют в течение нескольких часов при комнатной температуре против 500 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего 0,1% ДСН и 0,1% β-меркаптоэтанола.

Для приготовления образца смешивают в маленькой пробирке 3 мкл красителя (0,05%-ного раствора бромтимолового синего), 1 каплю глицерина, 5 мкл β-меркаптоэтанола и 50 мкл раствора А (см. ниже). Затем добавляют 10—50 мкл раствора белка, смесь перемешивают и наносят на поверхность геля. Раствор А, разбавленный в соотношении 1 : 1, осторожно наслаивают на образец до самого верха пробирки. Электродные сосуды заполняют буфером раствора А, разбавленным в два раза. Используют трубки размерами 10 см × 6 мм [80]. Электрофорез проводят при постоянном токе, причем сила тока составляет 8 мА на 1 трубку. Разделение продолжается в течение 4 ч. После электрофореза гели из-

влекают, окрашивают и измеряют, как обычно. Для отметки фронта растворителя используют медную проволоку № 32. Обычно на столбик геля наносят 10 мкг белка, но если краситель достаточно чувствителен для детектирования полосы, можно брать и меньшее количество белка. При нанесении на гель 100 мкг белка полоса имеет четкий передний фронт и размытый «хвост». Однако измерения в зоне переднего фронта дают хорошие результаты.

10%-ный разделяющий гель:

15 частей деаэрированного раствора А (0,78 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,86 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г ДСН на 100 мл).

13,5 частей раствора В (22,2 г акриламида и 0,6 г БИС на 100 мл), отфильтрованного через бумагу Whatman № 1. Хранят в темной склянке при 4 °С. Для получения нужной степени сшивки используют разное количество БИС. После смешивания растворов А и В смесь деаэрируют.

1,5 частей свежеприготовленного раствора В (1,5 г персульфата аммония на 100 мл).

0,045 частей ТЕМЭД.

Молекулярная масса нуклеиновых кислот

Значение R_m (электрофоретической подвижности) для рибонуклеиновой кислоты с низкой молекулярной массой [76] и рибосомной рибонуклеиновой кислоты [75] обратно пропорционально коэффициенту седиментации. Следовательно, логарифм молекулярной массы обратно пропорционален величине электрофоретической подвижности [78]. Диапазон этой пропорциональности зависит от степени сшивки геля.

Методы фракционирования низкомолекулярных олигонуклеотидов уже давно разработаны [72], тогда как определение молекулярных масс высокомолекулярных дезоксирибонуклеиновых кислот пока еще не применяется в повседневной работе.

Микрометод. Малые количества белков порядка нескольких микрограммов (10^{-6} г) или пикограммов (10^{-12} г) можно разделять в заполненных гелем капиллярных трубках различных размеров с помощью электрофореза в неоднородной («прерывистой») системе. Этот метод в основном сходен с описанным выше макрометодом, но для его применения необходим прибор,

приспособленный для проведения всех операций (заполнение трубок гелем, электрофоретическое разделение, извлечение гелей из трубок и их анализ) в малых масштабах.

Препаративные методики. Описанный выше микрометод нельзя превратить в столь же эффективную препаративную методику путем одного лишь увеличения размеров колонки. Чтобы увеличить количество разделяемого материала, можно использовать большое число трубок малых размеров, но в этом случае разделение становится трудоемкой и длительной процедурой. При использовании для электрофореза больших колонок возникают проблемы, связанные с извлечением разделенных веществ из геля, с отводом выделяющегося тепла, с необходимостью удерживать слой геля в колонке и т. д. При конструировании приборов, выпускаемых промышленностью, делаются попытки так или иначе решить все эти проблемы. Кроме того, нужный компонент можно извлечь из геля, вырезав соответствующий участок геля и элюировав этот компонент путем диффузии или с помощью электрофореза. Еще один способ извлечения разделенных веществ заключается в том, что им дают выйти из геля, после чего они с непрерывным потоком буфера поступают в коллектор фракций. Приборы для препаративного электрофореза должны удовлетворять следующим требованиям. Необходимо, чтобы гель удерживался в колонке благодаря установлению гидростатического равновесия между верхним и нижним буферами; следует возможно более точно регулировать температуру с помощью циркулирующей системы охлаждения; важно, чтобы камера для элюирования имела небольшой объем. Описан целый ряд гелей и буферных систем, применяемых для препаративных целей [66].

16.5.2. Иммуноэлектрофорез [65]

16.5.3. Изоэлектрическое фокусирование [63]

Изоэлектрическое фокусирование — это особый вид электрофореза, при котором происходит перемещение молекул через жидкостную колонку с постоянным гра-

диентом рН. Амфотерные молекулы, например молекулы белка, изменяют свой заряд по мере того, как пересекают градиент рН и попадают в зону, где значение рН равно изоэлектрической точке (pI) данного белка. В этом положении молекула белка несет равное число отрицательных и положительных зарядов и поэтому больше не перемещается в электрическом поле. В этой зоне устанавливается равновесие между силами диффузии и электрофоретической подвижностью. Таким образом, при изоэлектрическом фокусировании разделение основано на различиях в значениях pI у разных белков. Для устранения конвекции колонку стабилизируют либо с помощью градиента плотности сахарозы, либо посредством сефадекса или полиакриламида. Колонку заполняют специальным имеющимся в продаже материалом (амфолином), который представляет собой смесь амфолитов с различными значениями pI в определенном диапазоне. В электрическом поле молекулы амфолитов располагаются в соответствии с их изоэлектрическими точками и образуют стабильный градиент рН с высокой проводимостью и большой буферной емкостью. Введенная затем в колонку смесь белков распределяется по зонам, значения рН которых соответствуют изоэлектрическим точкам разделенных компонентов смеси. В продаже имеются амфолины с широкими и узкими диапазонами рН.

Изоэлектрическое фокусирование применяется как в препаративном, так и в аналитическом вариантах. Для аналитических целей используют методики, очень сходные с диск-электрофорезом в полиакриламидном геле, при этом полиакриламид с низкой степенью сшивки служит в качестве антиконвекционной среды. Для препаративного разделения можно использовать готовое оборудование или изготовить его самим.

Аналитические методики

Описаны четыре системы для изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле [66]. Система Кастимпуласа [69] рассматривается в следующем разделе. Трубку заполняют гелеобразующим раствором и подвергают его фотополимеризации, как при диск-элект-

рофорезе. Образец можно включить в состав полимеризующейся системы, соответственно уменьшив объем добавляемой воды. Согласно другой методике, в трубку вносят слой амфолина (2,5% в 5%-ном растворе сахарозы) и проводят электрофорез в течение 30 мин для установления градиента. Затем образец в 10%-ном растворе сахарозы осторожно наслаивают на поверхность геля под амфолином. В трубку размерами 5×65 мм вносят от 30 до 300 мкг белка. Электрофокусирование проводят при постоянном напряжении 150 В и силе тока, снижающейся от 5 до 0,5 мА.

Гели извлекают и окрашивают одним из принятых способов. Например, по методике Грэссилина и др. [73], гели окрашивают при осторожном перемешивании в течение 30—60 мин в 0,2%-ном растворе кумасси яркого синего G-250 в смеси этанол — вода — ледяная уксусная кислота (45:50:5, объем/объем). Для обесцвечивания гелей их обрабатывают тремя порциями смеси этанол — вода — ледяная уксусная кислота (40:55:5) в течение 2 ч.

Чтобы измерить образовавшийся в геле градиент рН, столбик геля перед окрашиванием разрезают в продольном направлении. Полученные срезы разрезают на части в поперечном направлении. Каждый срез выдерживают в течение 1 ч в минимальном количестве воды, например в 0,5 мл или еще меньшем объеме, а затем в экстрактах определяют рН с помощью стеклянного микроэлектрода.

При разделении белков с очень большой молекулярной массой эффект молекулярного сита можно уменьшить, если использовать смесь 0,5%-ная агароза — 2%-ный полиакриламид [79]. В нижний электродный буфер добавляют раствор метилового красного (0,5 части на 1 млн.). Раствор окрашивается в желтый цвет при переходе в более щелочную область геля.

Гель для изоэлектрического фокусирования [69].

4,5 части воды.

2 части раствора А (25 г акриламида и 1 г БИС на 100 мл воды).

0,5 частей раствора Б (1,0 мл ТЕМЭД на 100 мл воды).

2,5 частей раствора В (4 мг рибофлавина на 100 мл воды)

0,5 частей 40%-ного раствора амфолина

Верхний (анодный) электродный буфер представляет собой 5%-ный раствор фосфорной кислоты, а нижний (катодный) — 5%-ный раствор этилендиамина.

16.5.4. Двумерное разделение

Хорошо известно, что при разделении белков с помощью диск-электрофореза в одной полосе не всегда содержится только один белок, т. е. разделение сложных смесей может быть неполным. Наиболее эффективный подход предусматривает две стратегии разделения: на основе различий в размерах молекул и в значениях pI . Например, образец можно вначале подвергнуть изоэлектрическому фокусированию в полиакриламидном геле. Затем гель извлекают из трубки или (если электрофорез проводился на пластине) вырезают узкую полоску геля. Эту полоску помещают у верхнего края новой пластины геля в том месте, где обычно делают канавки для образцов, и закрепляют ее растопленным агаром. Проводят второй этап разделения — гель-электрофорез в присутствии ДСН, после чего гель окрашивают. Пример особенно эффективного разделения белков этим методом описан О'Фарреллом [77], которому удалось обнаружить 1000 белков в экстракте клеток *Escherichia coli*.

16.6. МАНОМЕТРИЯ

Манометрическое измерение обмена газов между биологическими системами и окружающей средой в прошлом было основным средством изучения метаболизма. Во многих случаях манометрия и сейчас имеет преимущество перед другими методами, а иногда это единственно возможный способ исследования. Однако из-за сложности всей системы, связанной с манометрическими измерениями, а также благодаря появлению новых методов, таких, как определение концентрации ионов с помощью ионселективных электродов или газожидкостная хроматография, манометрия настолько утратила свою популярность, что ей угрожает полное забвение. Конечно, трудно наладить настоящее «преподавание» манометрии в современных лабораториях при постоянной нехватке времени. Поэтому исследователю

приходится осваивать этот метод непосредственно в ходе проведения эксперимента. Поскольку манометрические методы позволяют осуществлять прямую и непрерывную регистрацию выделения или поглощения различных газов, таких, как кислород, водород, CO_2 , метан, а также ионы водорода, они находят широкое применение при исследовании гомогенатов тканей, клеточных и бактериальных суспензий и препаратов ферментов. Этот список можно дополнить косвенными методами, к которым относится, например, определение киназ на основе образования ионов водорода.

Основным источником информации в этой области и прекрасным руководством по многим аспектам метаболизма может служить книга Умбрейта и соавторов «Manometric Techniques» [82].

16.7. ЛИТЕРАТУРА

Фотометрия

Общая литература

1. *Bauman R. P.* Absorption spectrophotometry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1962.
2. *Brewer J. M., Pesce A. J., Ashworth R. B.* Experimental techniques in biochemistry, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1974. В гл. 7 рассмотрены теоретические аспекты адсорбции и флуоресцентного излучения.

Специальная литература

3. *Burke R. W., Mavrodineonu R.* Natl. Bur. Stand. Spec. Publ., **446** (1977).
4. *Lucas D. H., Blank R. E.* Am. Lab., **9**(11), 77—89 (1977).
5. *Slavin W.* Anal. Chem., **35**, 561—566 (1963).
6. *Vanous R. D.* Am. Lab., **10**(7), 67—79 (1978).
7. *West M. A., Kemp D. R.* Am. Lab., **9**(3), 37—49 (1977).

Ионные электроды

Общая литература

8. *Buck R. P.* Ion selective electrodes, Anal. Chem., **50**, 17R—29R (1978).
9. *Hitchman M. L.* Measurement of dissolved oxygen, Chem. Anal. Ser. Monogr. Chem., **49**, 1—255 (1978).
10. *Long C.* Biochemists handbook, p. 21. Van Nostrand Co., Princeton, N. J., 1961.

11. *Westcott C. C.* Biomedical pH measurements, *Am. Lab.*, **10**(3), 131—145 (1978).
12. *Westcott C. C.* Selection and care of pH electrodes, *Am. Lab.*, **10**(8), 71—73 (1978).

Специальная литература

13. *Estabrook R. W.* *Methods Enzymol.*, **10**, 41—47 (1967).
14. *LeBlanc P. J., Silwinski J. F.* *Am. Lab.*, **5**(7), 51—54 (1973).
15. *Rechnitz G. A.* *Am. Lab.*, **6**(2), 13—21 (1974).
16. *Toth K., Pungor E.* *Am. Lab.*, **8**(6), 9—18 (1976).

Хроматография

Общая литература

17. *Brewer J. M., Pesce A. J., Ashworth R. B.* *Experimental techniques in biochemistry*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1974.
18. *Determann H.* *Gel chromatography*, Springer Verlag, New York, 1968.
19. *Dunlap R. B. (ed.)*. *Immobilized biochemical and affinity chromatography*, Plenum Publishing Corp., New York, 1974.
20. *Gelotte B., Porath J.* In: *E. Heftman (ed.)*, *Chromatography*, 2nd ed., p. 343—369, Reinhold Publishing Corp., New York, 1967.
21. *Heftman E.* *Chromatography*, Van Nostrand-Reinhold, New York, 1975.
22. *Jakoby W. B., Welchek M. (ed.)*. *Methods Enzymol.*, **34**, 3—171 (1974).
23. *Khym J. X.* *Ion exchange procedures in chemistry and biology: theory, equipment, technology*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1974.
24. *Kirkland J. J. (ed.)*. *Modern practice of liquid chromatography*, Wiley Interscience, New York, 1971.
25. *McNair H. M., Bonelli E. J.* *Basic chromatography*, Varian Aerograph Co., Walnut Creek, Calif., 1967.
26. *Mitruka B. M.* *Gas chromatographic applications in microbiology and medicine*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975.
В книге уделено много внимания методам, применяемым в изучении микроорганизмов.
27. *Pharmacia Fine Chemicals Sephadex. Gel filtration in theory and practice*, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden.
28. *Whatman Inc. Liquid chromatography guide. Bulletin No. 123.* Whatman Inc., Clifton, N. J., 1977.
Один из нескольких коммерческих источников информации, особенно, по хроматографическим средам.

Специальная литература

29. *Alcock N. W.* *Methods Enzymol.*, **13**, 397—415 (1969).
30. *Andrews P.* *Biochem. J.*, **91**, 222—233 (1964).
31. *Asteriadis G. T., Armbruster M. A., Gilham P. T.* *Anal. Biochem.*, **70**, 64—74 (1976).
32. *Axen R., Porath J., Ernback S.* *Nature (London)*, **214**, 1302—1304 (1967).

33. *Blattner F. R., Erickson H. P.* Anal. Biochem., **18**, 220—227 (1967).
34. *Brooks J. B., Dowell V. R., Forsby D. S., Armfield A. R.* Can. J. Microbiol., **16**, 1071—1078 (1970).
35. *Brooks J. B., Moss C. W., Dowell V. R.* J. Bacteriol., **100**, 528—530 (1969).
36. *Cuatrecasas P., Parikh I.* Biochemistry, **11**, 2291—2299 (1972).
37. *Farshchi D., Moss C. W.* Appl. Microbiol., **17**, 262—267 (1969).
38. *Fuller A. J.* Br. J. Exp. Pathol., **19**, 130—139 (1938).
39. *Fulmer C. S., Wasserman R. H.* J. Biol. Chem., **254**, 7208—7212 (1979).
40. *Horii Z., Makita M., Tamura Y.* Chem. Ind. (London), **34**, 1494 (1965).
41. *Hummel J. P., Dreyer W. J.* Biochim. Biophys. Acta, **63**, 530—532 (1962).
42. *Krishnan N., Krishna G.* Anal. Biochem., **70**, 18—31 (1976).
43. *Laine R. A., Esselman W. J., Sweeley C. C.* Methods Enzymol., **28**, 159—178 (1972).
44. *LaNoue K., Nicklas W. J., Williamson J. R.* J. Biol. Chem., **245**, 102—111 (1970).
45. *Levin O.* Methods Enzymol., **5**, 27—33 (1962).
46. *Peterson E. A., Sober H. A.* Methods Enzymol., **5**, 3—27 (1962).
47. *Reinhold V. N.* Methods Enzymol., **25**, 244—249 (1972).
48. *Sober H. A., Gutter F. J., Wykoff M. M., Peterson E. A.* J. Am. Chem. Soc., **78**, 756—763 (1956).
49. *Sweeley C. C., Wells W. W., Bentley R.* Methods Enzymol., **8**, 95—108 (1966).
50. *Whitaker J. R.* Anal. Chem., **35**, 1950—1953 (1963).
51. *Yamakawa T., Ueta N.* Jpn. J. Exp. Med., **34**, 361—374 (1964).

Радиоактивность

Общая литература

52. *Brewer J. M., Pesce A. J., Ainsworth R. B.* Experimental techniques in biochemistry, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1974.
В гл. 8 рассматриваются теоретические аспекты измерения радиоактивности
53. *Horrocks D. D., Peng C.-T.* Organic scintillators and liquid scintillation counting, Academic Press Inc., New York, 1971.
54. *Oldham K. G.* Radiochemical methods in enzyme assay, Amersham Searle Co., Arlington Heights, Ill., 1976.

Специальная литература

55. *Anderson L. E., McClure W. O.* Anal. Biochem., **51**, 173—179 (1973).
56. *Anker H. S.* FEBS Lett., **7**, 293 (1970).
57. *Bush E. T.* Anal. Chem., **35**, 1024—1029 (1963).
58. *Fricke U.* Anal. Biochem., **63**, 555—558 (1975).
59. *Jeffay H.* Oxidation techniques for preparation of liquid scintillation samples. Packard Technical Bulletin 10, p. 1—8, Packard Instrument Co., Inc., Rockville, Md., 1962.

60. *Jeffay H., Alvarez J.* Anal. Chem., **33**, 612—615 (1961).
61. *Patterson M. S., Green R. C.* Anal. Chem., **37**, 854—857 (1965).
62. *Turner J. C.* Sample preparation for liquid scintillation counting, The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1967.

Гель-электрофорез

Общая литература

63. *Castimpoalas N.* Isoelectric focusing: fundamental aspects., Sep. Sci., **10**(1), 55—75 (1975).
64. *Davis B. J.* Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, Ann. N. Y. Acad. Sci., **12**, 404—427 (1964).
65. *Kochwa S.* Electrophoretic and immunoelectrophoretic characterization of immunoglobulins, p. 121—134. In: N. R. Rose and H. Friedman (ed.), Manual of clinical immunology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980.
66. *Mauer H. R.* Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. W. de Gruyter, New York, 1971.
67. *Ornstein L.* Disc electrophoresis. I. Back-ground and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 321—403 (1964).

Специальная литература

68. *Blakesly R. W., Boezi J. A.* Anal. Biochem., **82**, 580—582 (1977).
69. *Castimpoalas N.* Anal. Biochem., **26**, 480—482 (1968).
70. *Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. J.* Biol. Chem., **238**, 622—627 (1963).
71. *Dunker A. K., Rueckert R. R.* J. Biol. Chem., **244**, 5074—5080 (1969).
72. *Elson E., Jovin T. M.* Anal. Biochem., **27**, 193—204 (1969).
73. *Grasslin D., Weicker H., Barwich D. Z. Z.* Klin. Chem. Klin. Biochem., **8**, 288—291 (1970).
74. *Hedrick J. L., Smuth A. J.* Arch. Biochem. Biophys., **126**, 155—164 (1968).
75. *Loening U. E.* Biochem. J., **113**, 131—138 (1969).
76. *McPhie P., Hounsell J., Gratzner W. B.* Biochemistry, **5**, 988—993 (1966).
77. *O'Farrell P. J.* Biol. Chem., **250**, 4007—4021 (1975).
78. *Peacock A. C., Dingman C. W.* Biochemistry, **7**, 668—674 (1968).
79. *Riley R. F., Coleman M. K.* J. Lab. Clin. Med., **72**, 714—720 (1978).
80. *Weber K., Osborn M. J.* Biol. Chem., **244**, 4406—4412 (1969).
81. *Wright G. L.* Canalco Newsletter, no 10, p. 6. Canalco inc., Rockville, Md. (1968).

Манометрия

Общая литература

82. *Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.* Manometric techniques, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1957.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Р. Хансон, Дж. Филлипс

Методы, описанные в этой главе, широко используются в научно-исследовательской практике; вместе с тем их можно применять и в лабораторных занятиях студентов старших и выпускных курсов. В конце главы приводится список работ, в которых описаны другие методы, а также — более подробно — методики, рассмотренные в данной главе. Мы не обсуждаем здесь методы, требующие дорогостоящего оборудования или специального обучения персонала. Потребность в специальных методиках с вариациями в зависимости от природы анализируемых образцов, оборудования и квалификации сотрудников мы старались удовлетворить преимущественно за счет ссылок на другие источники информации, а не путем описания экспериментальных деталей.

17.1. ОСНОВНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ: ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ

Включение меченых соединений в бактериальные клетки применяется для определения скорости синтеза и количества синтезированных веществ, а также фракционирования низко- и высокомолекулярных соединений, содержащихся в клетках [2]. После инкубации клеток с меченым субстратом и фракционирования метаболитов в каждой фракции можно определить радиоактивность.

Макромолекулы осаждают с помощью охлажденного разбавленного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и отделяют от низкомолекулярных веществ центрифугированием. Надосадочная фракция низкомолекулярных веществ содержит пулы таких метаболитов, как углеводы и их производные, органические кислоты, аминокислоты, нуклеотиды и коферменты, а также олиго-

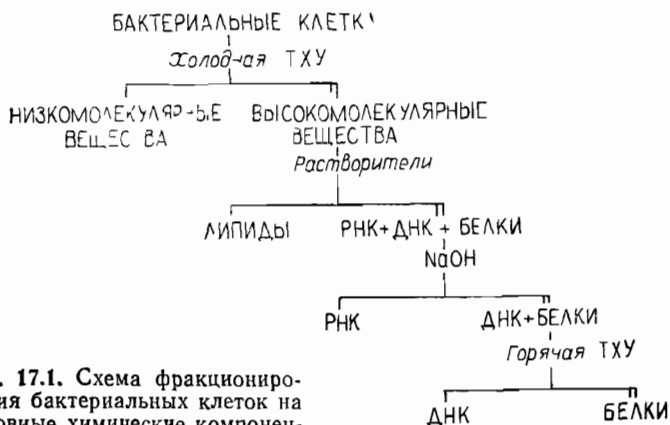


Рис. 17.1. Схема фракционирования бактериальных клеток на основные химические компоненты.

нуклеотиды и основные белки с числом нуклеотидных или аминокислотных остатков соответственно менее двадцати [2]. Осадок, содержащий макромолекулы, последовательно экстрагируют: липиды — органическими растворителями, РНК — щелочами, ДНК — горячей ТХУ. Осадок, остающийся после такого экстрагирования, содержит клеточные белки. На рис. 17.1 изображена схема процесса фракционирования.

Полное разделение всех химических компонентов и выделение макромолекул определенного типа в одной фракции невозможно осуществить с помощью какого-либо одного метода. Как правило, для этого приходится применять несколько методик. Ниже приведены методики фракционирования, описанные Кеннедом [1], которые представляют собой модификации методов Робертса и др. [2].

17.1.1. Реактивы и материалы

Физиологический раствор: 0,85%-ный (вес/объем) раствор NaCl в дистиллированной воде.

Растворы 50, 20, 10 и 5%-ной (вес/объем) ТХУ в дистиллированной воде. (*Предостережение!* ТХУ проникает через кожу, растворяется в липидах и вызывает раздражение кожи. В связи с этим с ней следует работать в резиновых перчатках, соответствующей лабораторной одежде и защитных очках)

Этанол: 70%-ный раствор (объем/объем) в дистиллированной воде. (*Предостережение!* Этанол легко воспламеняется. Следует избегать работы вблизи открытого огня и электрических приборов, вызывающих искрообразование.)

Диэтиловый эфир. (*Предостережение!* Эфир легко воспламеняется при контакте его паров с огнем или электрическими искрами. В лаборатории следует хранить минимальное количество эфира. Все растворы эфира нужно нагревать в герметичных контейнерах на водяной бане, а не в термостате. Чтобы избежать вдыхания паров эфира, следует работать под тягой.)

Гидроксид натрия (0,5 н.): растворяют 2,0 г в 100 мл дистиллированной воды.

Бычий сывороточный альбумин: растворяют 0,1 г в 10 мл дистиллированной воды и хранят в холодильнике.

Стеклопосуда. 20-мл пирексовые стеклянные химические стаканы, 10-мл колбы Эрленмейера, 25-мл мерные колбы, 15- и 30-мл центрифужные пробирки с крышками.

Фильтры с синтетическими мембранами или мембранами из стекловолокна с размером пор 0,45 мкм и диаметром 25 мм. Фильтры должны быть устойчивы к кислотам и растворителям. Пирексовый держатель для фильтрования должен быть снабжен пористой стеклянной прокладкой.

Колба для фильтрования под вакуумом на 125 мл и пробирки, обрезанные таким образом, чтобы при помещении в колбу они доходили до держателя фильтра. Пробирки служат для сбора фильтратов.

Инфракрасная лампа для нагревания мощностью 250 Вт и рефлектор для высушивания проб.

Баня с ледяной водой.

Водяные бани: температура регулируется до 80 °C.

Центрифуга с охлаждением: скорость до 10 000 g, ротор рассчитан на 30-мл центрифужные пробирки.

17.1.2. Мечение клеток

(*Предостережение!* Применение радиоактивных изотопов строго контролируется. Персонал, работающий с изотопами, должен быть знаком с соответствующими правилами (разд. 16.4.1). Необходимо соблюдение всех предосторожностей.)

Количество используемой культуры зависит от типа микроорганизма и условий его роста. Например, для получения 10 мг клеток *E. coli* достаточно 30 мл культуры, собранной в середине фазы экспоненциального роста.

Для определения состава клеток требуется равномерно меченный субстрат, например ^{14}C -глюкоза (5 мкКи/30 мл культуры, содержащей 1% глюкозы в

качестве единственного источника углерода). Включение аминокислоты в белок можно измерить, добавив меченую аминокислоту (2—5 мкКи) к 30 мл культуры, растущей на солевой среде с глюкозой. Для измерения включения определенной аминокислоты в белок идеально подходит ауксотрофный мутант, неспособный ее синтезировать. В этом случае к среде добавляют 10 мкг/мл немеченой аминокислоты и 2—5 мкКи меченой аминокислоты. Важно, чтобы в качестве предшественника меченого белка использовалась неметаболизируемая аминокислота. Лейцин, лизин, фенилаланин и тирозин метаболизируются большинством бактерий в очень незначительной степени. При работе с меченым тимидином в качестве предшественника ДНК и меченым урацилом или уридином в качестве предшественников РНК также рекомендуется использовать ауксотрофы, чтобы получить хорошее включение метки во фракциях.

Для изучения состава клеток обычно используют культуры в фазе экспоненциального роста. Во время лаг-фазы и стационарной фазы состав клеток отличается от состава в экспоненциальной фазе роста.

17.1.3. Низкомолекулярные вещества

1. Культуру быстро охлаждают, помещая ее в лед. Радиоактивно меченные клетки (около 10 мг сухого веса биомассы) отделяют от ростовой среды центрифугированием (5000 g, 10 мин, 5°C). Осажденные клетки дважды промывают физраствором ($1/5$ объема культуры), центрифугируя их при 5°C.

2. Клетки суспендируют в 10 мл дистиллированной воды в центрифужной пробирке. Суспензию помещают в ледяную баню и добавляют к ней 10 мл холодной ТХУ. Центрифужную пробирку закрывают крышкой и переворачивают для перемешивания содержимого. Пробирку помещают на 5 мин в ледяную баню для полного выпадения осадка.

3. Пробирку центрифугируют при 5000—10 000 g в течение 15 мин при температуре 0—4°C и надосадочную фракцию осторожно декантируют в 25-мл мерную колбу, не взбалтывая осадка.

4. К осадку добавляют 4 мл 10%-ной холодной ТХУ, суспендируют его и вновь центрифугируют. Надосадочную фракцию объединяют с надосадочной жидкостью, полученной после первого центрифугирования, и разбавляют дистиллированной водой до 25 мл.

5. Определяют радиоактивность объединенной фракции, содержащей низкомолекулярные вещества (пул метаболитов) непосредственно в растворе, применяемом для определения радиоактивности в водных образцах, как описано в предыдущей главе (разд. 16.4.2). Чтобы внести поправку на тушение флуоресценции за счет ТХУ, используют внутренние или внешние стандарты. В другом варианте ТХУ удаляют путем трехкратного экстрагирования равными объемами эфира. Однако в процессе экстрагирования эфиром из низкомолекулярной фракции удаляются органические кислоты. Радиоактивность в образцах проэкстрагированной фракции измеряют в сцинтилляционной смеси, применяемой для водных растворителей, или же после высушивания под лампой накаливания в сцинтилляционной смеси на основе толуола (разд. 16.4.3).

17.1.4. Липиды

1. Чтобы выделить липиды из осажденной в центрифужной пробирке фракции макромолекул, осадок суспендируют в 10 мл охлажденной 10%-ной ТХУ во встряхивателе Vortex. (*Предостережение!* Во время суспендирования пробирку следует закрывать во избежание разбрызгивания аэрозолей ТХУ и радиоизотопов.)

2. 1 мл гомогенной суспензии фильтруют и фильтр дважды промывают 2 мл охлажденной 10%-ной ТХУ. Затем для удаления остатков ТХУ, которая может вызывать солюбилизацию части белка на следующем этапе, фильтр промывают 3 мл охлажденного 70%-ного этанола. Фильтрат выливают.

3. Колбу с фильтром и пробирку для сбора фильтрата помещают в термостат при 45 °С. После нагревания до 45 °С колбу вынимают из термостата, быстро наносят на фильтр 10 мл 70%-ного этанола (нагретого до 45 °С в водяной бане) и ждут, пока растворитель медленно пройдет через фильтр. Фильтрат собирают в пробирку.

Для того чтобы прошла экстракция, фильтрование должно длиться ~ 10 мин.

4. Фильтр промывают в вытяжном шкафу 2—5 мл смеси этанола и диэтилового эфира (1:1, объем/объем), нагретой до 45°C в водяной бане, медленно пропуская растворитель через фильтр (в течение 10 мин). Фильтрат собирают в пробирку и объединяют с нагретым до 45°C этанолом, использовавшимся для промывания на этапе 3. Фильтр с остатками осажденной фракции макромолекул сохраняют для дальнейшего фракционирования.

5. Объем объединенных фильтратов доводят до 25 мл, образец высушивают в сцинтилляционном флаконе под струей профильтрованного воздуха при 40°C . Воздух фильтруют, пропуская его под давлением через стекловату.

6. Определяют радиоактивность высушенного образца липидов в сцинтилляционной смеси на основе толуола (разд. 16.4.3).

17.1.5. Рибонуклеиновые кислоты

1. После удаления липидов из осажденной фракции макромолекул можно выделить РНК. Фильтр с осадком вынимают из держателя (см. выше этап 4), помещают в 20-мл химический стакан и высушивают в течение 10 мин на воздухе в вытяжном шкафу.

2. В стакан на фильтр наносят 2 мл 0,5 н. NaOH (подогретого до 37°C) и инкубируют, изредка встряхивая, при 37°C в течение ровно 40 мин. Важно, чтобы фильтр был полностью покрыт раствором NaOH. Более продолжительная инкубация может привести к гидролизу некоторых белков [1, 3].

3. Стакан переносят в лед и быстро охлаждают. Добавляют 0,6 мл охлажденной 50%-ной ТХУ, перемешивают и оставляют во льду приблизительно на 30 мин.

4. Раствор переносят из стакана на новый фильтр, укрепленный на держателе, фильтруют под вакуумом и собирают кислоторастворимые вещества в пробирку. К первому фильтру в стакан наливают 3 мл холодной 5%-ной ТХУ, переносят этот раствор на второй фильтр и собирают фильтрат в ту же пробирку, где уже нахо-

дится первый фильтрат. Объединенный фильтрат разбавляют в мерной колбе до 15 мл дистиллированной водой. Этот фильтрат содержит около 95% рибонуклеотидов РНК.

5. Определяют радиоактивность гидролизованной фракции РНК так же, как радиоактивность низкомолекулярной фракции (см. выше и разд. 16.4.3).

17.1.6. Дезоксирибонуклеиновая кислота

1. После удаления липидов и РНК из макромолекулярной фракции ДНК выделяют из осажденной фракции макромолекул на фильтре, обрабатывая его горячей ТХУ. В эксперименте используют второй образец, который получают после суспендирования осадка в холодной ТХУ, как описано для первых этапов фракционирования липидов (разд. 17.1.4). Повторяют этапы 1—4 по удалению липидов. После промывания фильтра этанолом и смесью этанола и эфира для удаления липидов фильтр помещают в химический стакан, добавляют 2 мл 0,5 н. NaOH, перемешивают и инкубируют в течение 90 мин при 37°C. Период инкубации с NaOH увеличивают для того, чтобы прошел полный гидролиз РНК. ДНК присутствует в меньших количествах, чем РНК, и поэтому следы негидролизованной РНК могут завышать оценку радиоактивности ДНК. Солюбилизация некоторых белков не влияет на результат определения радиоактивности ДНК.

2. Стакан с фильтром охлаждают во льду, добавляют 0,6 мл охлажденной 50%-ной (вес/объем) ТХУ и оставляют во льду на 30 мин. Затем раствор из стакана выливают на новый фильтр, предварительно замоченный в охлажденной 5%-ной ТХУ. Фильтруют под вакуумом. Первый фильтр дважды промывают 3 мл охлажденной 5%-ной ТХУ и фильтрат выливают.

3. Оба фильтра помещают в 10-мл колбу Эрленмейера, добавляют 3 мл 5%-ной ТХУ и нагревают 30 мин на водяной бане при 80°C. Фильтры при этом должны быть полностью погружены в жидкость.

4. Добавляют 0,1 мл раствора бычьего сывороточного альбумина (1,0 мг/мл), быстро перемешивают, охлаждают колбу 30 мин в ледяной бане и фильтруют со-

держась в ней раствор через новый фильтр. Добавлением бычьего сывороточного альбумина обеспечивается более полное осаждение высокомолекулярных веществ, которые в противном случае могут остаться в суспензии. Для ускорения фильтрации применяют слабый вакуум. Фильтрат собирают в пробирку, помещенную в колбу. Колбу Эрленмейера и фильтры дважды промывают 3 мл охлажденной 5%-ной ТХУ. Фильтраты собирают в ту же пробирку. Объединенный фильтрат разбавляют водой до 15 мл в мерной колбе, а фильтры выбрасывают.

5. Радиоактивность фракции гидролизованной ДНК определяют так же, как в случае низкомолекулярной фракции (см. выше и разд. 16.4.3).

17.1.7. Белки

1. Для выделения белков из осажденной фракции макромолекул используют второй образец осадка, суспендированного в охлажденной ТХУ, как описано в 1-м этапе фракционирования липидов. 1 мл образца вносят в пробирку 15×100 мм и разбавляют 1 мл воды до 5%-ной (вес/объем) концентрации ТХУ.

2. Разбавленную пробу нагревают 30 мин при 80°C для гидролиза РНК и ДНК.

3. Гидролизованную пробу охлаждают во льду в течение 30 мин для осаждения белков. Осадок собирают на фильтре, фильтрат выбрасывают. Пробирку дважды споласкивают 2 мл охлажденной 10%-ной ТХУ и 1 раз 3 мл охлажденного 70%-ного этанола и наносят эти растворы на фильтр для удаления остатков ТХУ, которая в противном случае приведет к солюбилизации некоторой части белка на следующем этапе.

4. Фильтр дважды промывают 5 мл 70%-ного этанола (45°C) и дважды 5 мл смеси этанол — диэтиловый эфир при 45°C.

5. Фильтр высушивают на воздухе, помещают в сцинтилляционный флакон и сушат под лампой накаливания.

6. Определяют радиоактивность высушенного на фильтре белка в сцинтилляционной смеси на основе толуола (разд. 16.4.3).

17.1.8. Применение методов фракционирования

Описанные выше методики обычно применяют для фракционирования бактериальных клеток, меченных одним из компонентов среды, который неспецифически включается во все молекулы клеток. При инкубировании бактериальных клеток в присутствии специфического предшественника макромолекулярного вещества для измерения скорости его синтеза важно определить, что данное вещество содержит всю радиоактивность. Это делают путем фракционирования клеток и подсчета радиоактивности каждой фракции по описанным выше методикам. Если в изучаемой фракции содержится вся радиоактивность, то дальнейшие эксперименты можно упростить. Например, если для определения количества синтезируемой ДНК применяется радиоактивный тимидин и в предварительных опытах показано, что он не включается в другие фракции, то клетки в культуральной среде обрабатывают следующим образом. Среду охлаждают и добавляют к ней охлажденную 10%-ную ТХУ. Осадок, содержащий ДНК, собирают на фильтре, промывают охлажденным этанолом, высушивают и подсчитывают в нем радиоактивность. Эта методика применима для определения количества синтезируемой ДНК, а также белка или РНК, если предшественник последних обнаруживается только в одной фракции.

При определении скорости синтеза различных веществ учитывают и другие факторы. Прежде всего это разбавление добавляемых извне субстратов немечеными предшественниками, имеющимися в клеточных пулах. В кинетических экспериментах необходимо определить скорость насыщения пула радиоактивными предшественниками. В описанных выше методиках при использовании для оценки распределения радиоактивности ^{14}C -соединений некоторые клеточные компоненты не учитываются. Например, во фракции РНК оказываются продукты гидролиза тейхоевых кислот и полифосфатов, а вместе с белком осаждаются пептидогликан.

Поли- β -гидроксибутират, если он присутствует, можно экстрагировать смесью хлороформ—метанол (2:1, объем/объем) при 60°C после промывания смесью эфир—этанол. В случае применения указанных раство-

рителей фильтры должны быть устойчивы к метанолу и хлороформу, а экстракцию следует проводить в вытяжном шкафу (разд. 17.3.1).

Полисахариды частично экстрагируются охлажденной ТХУ и могут существенно влиять на оценку радиоактивности низкомолекулярных веществ. Большие количества полисахаридов создают серьезные трудности при применении неспецифических предшественников, таких, как радиоактивная глюкоза. В этом случае применяют модифицированные методики [3].

У некоторых бактериальных клеток пулы низкомолекулярных веществ частично утрачиваются во время центрифугирования и промывания. Ряд бактерий обладает высокой нуклеазной или протеолитической активностью, которая может во время их сбора или промывания еще больше возрасть.

Если на первых этапах брать меньшие количества исходного материала, чем указано в методике, происходят значительные потери высокомолекулярных веществ. Чтобы улучшить осаждение макромолекул, в качестве носителя можно добавлять немеченые бактериальные клетки. ДНК и белок лучше осаждаются при добавлении к растворам сывороточного альбумина.

Фракционирование каждого нового микроорганизма потенциально представляет собой проблему. Хотя описанные здесь методики широко применяются на практике, при интерпретации результатов каждый раз следует проверять, достигнуто ли полное разделение низко- и высокомолекулярных веществ [3].

Другие методы обработки образцов описаны в работах [2, 3]. Однако при их применении вероятность перекрестного загрязнения фракций выше, чем в описанной здесь процедуре.

17.2. УГЛЕВОДЫ

Бактерии содержат много различных углеводов: свободные сахара, производные сахаров, простые полисахариды (полимеры, состоящие из одного сахара или производного сахара, такие, как гликоген), сложные полисахариды (полимеры, состоящие из нескольких сахаров, аминсахаров, уроновых кислот и т. д.) и макро-

молекулы, включающие углеводные и неуглеводные компоненты (липополисахариды, пептидогликаны, тейхоевые, липотейхоевые, тейхоуроновые, нуклеиновые кислоты, гликопротеины и т. д.).

Колориметрические методы, основанные на пробе Молиша на углеводы [4, 7, 8], пригодны для количественного определения простых сахаров и их полимеров. Специальные методики определения пентоз в нуклеиновых кислотах (рибозы и дезоксирибозы) описаны ниже в разделе, посвященном нуклеиновым кислотам (разд. 17.5.1 и 17.5.2). Более полные описания аналитических методов определения углеводов сделаны Гербертом и сотр. [5] и Коловиком и Капланом [4].

17.2.1. Определение общего количества углеводов антроновым методом

Наиболее удобные способы определения общего количества углеводов включают нагревание среды, клеток или выделенных углеводов с серной кислотой с целью гидролиза полисахаридов, а также дегидратации моносахаридов. При этом из пентозы образуются фурфуролы, а из гексозы — гидроксиметилфурфуролы. Затем растворы фурфуролов и гидроксиметилфурфуролов обрабатывают реактивом (ароматическим амином или фенолом) для получения окрашенного соединения, которое анализируют колориметрически или спектрофотометрически. Описано много вариантов этой методики, называемой пробой Молиша [4, 7, 8]. В этих реакциях пентоза, гексоза и гептоза, а также их производные (за исключением аминсахаров) дают окрашенные вещества, тогда как триоза и тетроза не образуют хромофоров.

Ни одна из этих методик не позволяет точно определить все углеводы, содержащиеся в бактериях, так как для разных сахаров интенсивность окраски при данной длине волны различна [5]. Описанные ниже методики с использованием антрона и фенола отличаются простотой. При их выполнении почти не мешают другие клеточные компоненты, а наиболее распространенные в микробных клетках гексозы дают сходную реакцию, что обеспечивает надежное определение общего содержания углеводов.

Обе методики позволяют определять общее количество углеводов в бактериальных клетках, содержащих $\geq 10\%$ полимеров гексозы. При низком содержании гексоз в клетках пентозы в нуклеиновых кислотах мешают определению.

Реактивы и оборудование

Физиологический раствор: 0,85%-ный (вес/объем) раствор NaCl в дистиллированной воде.

Основной раствор глюкозы: 100 мг глюкозы растворяют в 100 мл 0,15%-ной (вес/объем) бензойной кислоты, используемой в качестве консерванта. Хранят при 5 °C. Раствор годен в течение нескольких месяцев. Перед использованием раствор разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1 : 10 для получения концентрации глюкозы 100 мкг/мл. Из разбавленного раствора готовят стандартные (10—100 мкг/мл) растворы глюкозы.

Раствор серной кислоты (75%-ный, объем/объем): 750 мл концентрированной чистой серной кислоты (ч. д. а.; reagent-grade) добавляют к 250 мл дистиллированной воды. (*Внимание!* Кислоту медленно вливают в воду, находящуюся в сосуде из пирекса. Нельзя вливать воду в кислоту. Другие предосторожности описаны в разд. 17.2.2).

Антроновый реактив: 200 мг антрона добавляют к 5 мл абсолютного этанола и разбавляют до 100 мл 75%-ной H_2SO_4 . (*Предостережение!* См. разд. 17.2.2.) Перемешивают до растворения. Ежедневно готовят свежий раствор и хранят его в холодильнике.

Толстостенные пирексовые термостойкие пробирки размером 15×2,5 см.

Спектрофотометр или колориметр.

Стекланные кюветы.

Методика

Бактериальные клетки отмывают от компонентов среды центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин. Осадок суспендируют в физиологическом растворе и вновь центрифугируют. Осажденные клетки ресуспендируют в дистиллированной воде, отбирают пипеткой пробы клеточной суспензии (0,1—1,0 мл) и вносят их в термостойкие пробирки. Объем во всех пробах доводят дистиллированной водой до 1 мл. Готовят контрольную пробу дистиллированной воды (1,0 мл) и стандарты, содержащие от 10 до 100 мкг глюкозы в 1,0 мл. Пробирки и антроновый реактив охлаждают в бане со льдом. Добавляют 5 мл охлажденного антронового реак-

тива, быстро перемешивают, встряхивая пробирки в ледяной воде, и затем продолжают перемешивание в ледяной бане в течение 5 мин. Пробирки переносят в кипящую баню ровно на 10 мин, после чего помещают их в ледяную воду. Измеряют интенсивность окраски в каждой пробирке с помощью спектрофотометра или колориметра при длине волны 625 нм (разд. 16.1.1). Концентрацию глюкозы в пробах определяют по калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью стандартных растворов и концентрацией глюкозы.

17.2.2. Определение общего содержания углеводов в реакции с фенолом

Реактивы и оборудование

Фенольный реактив: 5 г чистого (ч. д. а.; reagent-grade) фенола растворяют в 100 мл дистиллированной воды. (*Осторожно!* Фенол вызывает тяжелые ожоги кожи и глаз. При работе с ним нужно надевать защитные очки, перчатки и одежду. Нельзя касаться его в пипетку ртом.)

Концентрированная чистая (ч. д. а.; reagent-grade) серная кислота. (Меры предосторожности при работе с ней см. ниже.)

Стандартные растворы глюкозы (см. выше описание методики с антроном).

Толстостенные пирексовые термостойкие пробирки размером 15×2,5 см.

Спектрофотометр или колориметр.

Стеклянные кюветы.

Методика

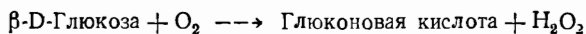
Анализируемые пробы вносят пипеткой в толстостенные пирексовые пробирки. Объем в каждой пробе доводят дистиллированной водой до 1,0 мл. Готовят контрольную пробу с 1,0 мл дистиллированной воды и серию стандартных растворов глюкозы с концентрациями от 10 до 100 мкг/мл. Во все пробы добавляют 1 мл фенольного реактива, быстро и тщательно перемешивают. Затем добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты, так же быстро перемешивают и оставляют на 10 мин. (*Осторожно!* При добавлении серной кислоты происходит нагревание, а иногда и разбрызгивание сме-

си, что может вызвать тяжелые ожоги при попадании на кожу или в глаза. Необходимо пользоваться защитными очками и перчатками. Нельзя насасывать раствор в пипетку ртом. Необходимо знать меры по оказанию первой помощи при попадании кислот на кожу и в глаза.) Пробирки помещают на 15 мин в водяную баню с температурой 25 °С и затем снимают показания оптической плотности в каждой пробе при 488 нм против контрольного образца, приготовленного без глюкозы (разд. 16.1.1). Концентрацию глюкозы в пробах определяют по стандартной калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью стандартных растворов и концентрацией глюкозы.

17.2.3. D-Глюкоза

В результате гидролиза простых и сложных полисахаридов в бактериальных клетках образуется большое число моносахаридов. Поскольку полимеры состоят из различных мономеров, за исключением гомополимеров, таких, как гликоген, количественное определение отдельных сахаров представляет собой сложную аналитическую проблему, которую порой можно решить лишь с помощью газожидкостной хроматографии [16]. Однако некоторые сахара и производные сахаров определяют с помощью специфических колориметрических реакций или ферментативных методов [4]. Ниже приведем определения содержания двух наиболее широко распространенных сахаров

Фермент глюкозооксидаза катализирует следующую реакцию:



Перекись водорода в присутствии пероксидазы и восстановленного хромофора приводит к образованию окисленного хромофора, окрашенного в коричневый или синий цвет, количество которого можно измерить спектрофотометрически. В качестве хромофоров используются различные вещества. Смесь ферментов, необходимых для анализа, можно приобрести в комплекте у различных фирм.

Глюкозооксидазный тест специфичен, чувствителен и прост в осуществлении. Окрашенные вещества в этой реакции появляются только за счет глюкозы и 2-дезоксиглюкозы.

Реактивы

Основной раствор глюкозы: 300 мг D-глюкозы растворяют в 100 мл 0,15%-ной (вес/объем) бензойной кислоты. Хранят в холодильнике. Перед применением разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1 : 10 и доводят рН до 7,0.

Коммерческий препарат глюкозооксидазы—пероксидазы. Готовят смесь ферментов, как указано в инструкции к препарату.

Хромофор. Входит в комплект имеющихся в продаже реактивов. Готовят согласно инструкции.

Методика

Пробы разбавляют дистиллированной водой так, чтобы они содержали 0,05—0,3 мг глюкозы в 1 мл. Устанавливают рН от 6,8 до 7,2 добавлением 0,1 н. КОН или 0,1 н. HCl. Для определения рН можно пользоваться индикаторной бумагой. Готовят контрольную пробу и серию стандартов, содержащих 0,05—0,3 мг глюкозы в 1 мл, путем разбавления дистиллированной водой. Добавляют фермент и хромофор и инкубируют смесь согласно инструкции фирмы-изготовителя. Добавляют пастеровской пипеткой 1 каплю 4 н. HCl и определяют оптическую плотность в стеклянной кювете при 400 нм (разд. 16.1.1). Определяют концентрацию глюкозы в пробах по стандартной калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью стандартных растворов и концентрацией глюкозы.

17.2.4. Галактоза

Комплект реактивов для определения галактозы с помощью галактозооксидазы также можно приобрести у различных фирм. В комплект входят галактозооксидаза, хромофор и стандарты. Поскольку галактозооксидаза окисляет C₆-гидроксиметильную группу галактозы с образованием галактуроновой кислоты, она может окислять и некоторые галактозиды.

Применение оксидазного теста на глюкозу и галактозу

Оксидазный тест на глюкозу и галактозу позволяет определять содержание этих веществ в ростовых средах, в нейтрализованных гидролизатах полисахаридов и в ферментных реакционных смесях, например содержание глюкозы при ферментативном гидролизе целлюлозы, и т. п. Глюкозооксидаза окисляет только β -D-глюкозу, но в присутствии мутаротазы (входящей в некоторые имеющиеся в продаже препараты) она позволяет определять и α -D-глюкозу. Для проверки возможного влияния солей и других ингибиторов в каждый неизвестный раствор целесообразно добавлять стандарт без углеводов.

17.2.5. Гликоген

Оценить содержание у бактерий любого простого полисахарида, кроме гликогена, с помощью несложных методик довольно трудно. Здесь мы опишем способ выделения гликогена, так как этот полимер служит резервным материалом у многих бактерий и может составлять значительную часть их биомассы. Способы выделения других широко распространенных сложных полисахаридов (липополисахаридов и пептидогликанов) приведены в других разделах. Гликоген, как и другие полисахариды, устойчив к гидролизу щелочами, он хорошо растворим в воде и нерастворим в этаноле. Выделение полимера основано на использовании именно этих свойств. Содержание глюкозы в выделенном гликогене можно определить в кислотных гидролизатах с помощью реакций с антроном или фенолом или с помощью глюкозооксидазного теста после 6-часового гидролиза полисахарида в 4 н. HCl при 100 °C в запаянной ампуле.

Реактивы и оборудование

Абсолютный этанол.

Гидроксид калия: 30%-ный (вес/объем) раствор в дистиллированной воде. (*Осторожно: щелочь! Нельзя насасывать раствор в пипетку ртом. Следует избегать попадания реактива на кожу и в глаза.*)

Центрифуга с охлаждением, работающая со скоростями до 10 000 g.

30-мл стеклянные центрифужные пробирки.

Методика

Клетки собирают центрифугированием при 5000—10 000 g в течение 15 мин, ресуспендируют в равном объеме физиологического раствора и снова центрифугируют. Еще раз промывают клетки, центрифугируют и лиофилизуют их (разд. 12.2.1). 100 мг сухих клеток помещают в пирексовую или кимаксовую пробирку, имеющую завинчивающуюся крышку с тефлоновой прокладкой, вносят в нее 1 мл 30%-ного КОН и инкубируют в паровой или кипящей бане в течение 3 ч при 100°C. Если лиофилизация нецелесообразна, суспендируют 500 мг сырых клеток в 0,6 мл 50%-ного (вес/объем) КОН и нагревают при 100°C для солюбилизации гликогена. Охлаждают пробирку, не открывая ее. После охлаждения добавляют 3 мл дистиллированной воды и 8 мл этанола для осаждения гликогена. Центрифугируют при 10 000 g в течение 15 мин и осадок промывают 8 мл 60%-ного охлажденного этанола путем центрифугирования. Высушивают осадок в вакуумном эксикаторе. В промытом осадке можно определить глюкозу антроновым или фенольным методом (разд. 17.2.1 и 17.2.2). Можно также провести гидролиз для получения глюкозы и дальнейшего ее определения по глюкозооксидазной методике (разд. 17.2.3). Для полной экстракции гликогена из грамположительных клеток иногда требуется их механическое разрушение [9].

17.2.6. Определение гексозаминов в очищенных пептидогликанах [5, 8—12]

Гексозамины присутствуют в липополисахаридах, пептидогликанах и тейхоевых кислотах бактерий. Наиболее распространенные гексозамины — это глюкозамин, галактозамин и мурамовая кислота. Все N-ацетилированные гексозамины реагируют с *n*-диметиламинобензальдегидом, вызывая образование продукта, окрашен-

ного в красный цвет. Этот тест очень чувствителен и специфичен для гексозаминов, однако он не позволяет дифференцировать глюкозамин, мурамовую кислоту и галактозамин. Мурамовую кислоту можно определять отдельно с помощью других методик (разд. 17.2.8).

Модифицированная методика Гуйзена и др. [11] более точна и удобна, чем описанная ниже методика Моргана—Элсона. Она позволяет определять суммарные гексозамины в очищенных пептидогликанах. Однако для определения гексозаминов в сложных полимерах или бактериальных клетках требуется отделить их от нейтральных сахаров методом ионообменной хроматографии, как это описано в следующей методике.

Реактивы и оборудование

Реактив Моргана—Элсона 16 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в достаточном количестве уксусной кислоты для получения конечного объема 95 мл. Добавляют 5 мл концентрированной HCl. Разбавляют уксусной кислотой в соотношении 1 : 5 для получения окрашивающего реактива. (*Предостережение!* Необходимо работать в вытяжном шкафу во избежание вдыхания паров соляной и уксусной кислот. Во время приготовления и применения реактива следует надевать защитные перчатки, одежду и очки)

3 н. HCl.

3 н. NaOH.

Насыщенный раствор бикарбоната натрия К 100 мл дистиллированной воды добавляют ~15 г NaHCO₃ и перемешивают в течение 15 мин при комнатной температуре.

5%-ный (объем/объем) уксусный ангидрид в дистиллированной воде готовят непосредственно перед применением и держат во льду. (*Предостережение!* Во избежание попадания жидкости или паров на кожу и в глаза необходимо работать в вытяжном шкафу. Нельзя касаться раствора в пипетку ртом.)

5%-ный раствор K₂B₄O₇ в дистиллированной воде.

Стандартный раствор глюкозамина: 17,92 мг глюкозамина растворяют в 10 мл 3 н. HCl. Основной раствор хранят в холодильнике. Ежедневно готовят свежий раствор. Стандартный основной раствор содержит 0,2 мкмоль глюкозамина в 20 мкл. Раствор разбавляют 3 н. HCl для получения стандартных растворов, содержащих от 0,01 до 0,2 мкмоль глюкозамина в 20 мкл.

Ампулы: 1-мл ампулы для лиофилизации или 1-мл пробирки, имеющие закручивающиеся крышки с тефлоновыми прокладками.

Пирексовые пробирки на 3 мл.

Спектрофотометр или колориметр.

Стекланные кюветы на 1 мл.

Методика

Ллиофилизуют одну или несколько проб, содержащих от 0,01 до 0,1 мкмолья гексозамина. В каждую пробу добавляют по 20 мкл 3 н. HCl. Готовят стандартные растворы глюкозамина (0,01—0,2 мкмолья на 20 мкл 3 н. HCl). Пробы и стандартные растворы нагревают при 95°C в течение 4 ч. в запаянных ампулах или пробирках. Гидролизаты охлаждают и нейтрализуют добавлением 20 мкл 3 н. NaOH. В 3-мл пробирки переносят по 30 мкл каждого гидролизата. Добавляют по 10 мкл насыщенного раствора NaHCO_3 и по 10 мкл свежеприготовленного 5%-ного уксусного ангидрида. Пробирки оставляют на 10 мин при комнатной температуре; в это время происходит N-ацетилирование гексозаминов. Затем пробирки погружают в кипящую воду ровно на 3 мин для разрушения непрореагировавшего уксусного ангидрида. Добавляют 50 мкл 5%-ного раствора $\text{K}_2\text{V}_4\text{O}_7$, перемешивают и нагревают в кипящей бане в течение 7 мин. Охлаждают и добавляют 0,7 мл окрашивающего реактива (разбавленный в соотношении 1:5 реактив Моргана—Элсона). Смесь снова перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 20 мин. Измеряют поглощение пробы в каждой пробирке при 585 нм в 1-мл стеклянных кюветах (разд. 16.1.1).

Суммарное содержание гексозаминов в каждой пробе определяют по стандартной калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью при 585 нм и количеством гексозамина в стандартных растворах (разд. 16.1.1). Глюкозамин, галактозамин и мурамовая кислота имеют одинаковый коэффициент молярной экстинкции.

Применение методики

Как упоминалось выше, эта методика непригодна для идентификации гексозаминов в сложных смесях сахаров и их производных. Производные гексозамина, такие, как N-ацетилмурамовая кислота, связанная с пептидами (которые могут отщепляться под действием лизоцима), образуют одинаковые окрашенные продукты.

Решающее значение в реакции имеет степень нейтрализации HCl после гидролиза пробы, которая должна быть абсолютной. Поэтому важно тщательно готовить растворы HCl и NaOH и хорошо запаивать ампулы или закрывать пробирки перед гидролизом образцов.

Количественное определение глюкозамина, галактозамина и мурамовой кислоты по отдельности можно проводить с помощью методики, описанной Стьюартом-Туллом [15]. Другие тесты на мурамовую кислоту приведены в разд. 17.2.8.

17.2.7. Гексозамины в сложных растворах

Гексозамины в сложных растворах, а также образующиеся при гидролизе смешанных полимеров можно отделить от нейтральных сахаров, мешающих определению в реакции Моргана — Элсона, с помощью ионообменной хроматографии. После очистки гексозамины количественно анализируют по описанной выше модифицированной методике Моргана — Элсона.

Реактивы и оборудование

4 н. HCl.

1 н. NaOH.

Ампулы для лиофилизации или пирексовые пробирки, имеющие завинчивающиеся крышки с тефлоновыми прокладками.

Колонки с дауэксом-50 (H⁺). Ионообменную смолу дауэкс-50 добавляют (по 1 г на каждую анализируемую пробу) к 2 н. NaOH (20 мл/г смолы). Перемешивают 5—10 мин и фильтруют через воронку Бюхнера. Смолу промывают дистиллированной водой (50 мл/г) и медленно перемешивают с 3 н. HCl (20 мл/г). Удаляют HCl фильтрованием через воронку Бюхнера и промывают смолу на фильтре 2—5 л дистиллированной воды для удаления кислоты. Удаляют воду путем отсасывания и суспендируют смолы в дистиллированной воде (1 г/5 мл). 5 мл суспензированной смолы набирают в пастеровскую пипетку или 3-мл шприц с иглой № 18, у основания которого помещен тампон из стекловаты. К пипетке или шприцу присоединяют резиновую трубку с зажимом на конце для регулирования потока вытекающего раствора. Необходимо следить, чтобы уровень жидкости не опускался ниже уровня смолы.

Вакуумный эксикатор с гранулами NaOH.

Воронка с мелкопористым стеклянным фильтром.

Воронка Бюхнера.

Методика

Пробу, анализируемую на гексозамины, перемешивают с 4 н. HCl в маленькой ампуле для лиофилизации. Количество материала и кислоты зависит от того, какой материал используется. Пробы должны содержать 50—100 мг (сухого веса) бактериальных клеток или немного меньше очищенного материала в 3 мл 4 н. HCl . В каждой пробе должно быть 150—500 г гексозамина в 3 мл. Препарат гидролизуют 6 ч при 100°C в запаянной ампуле, через которую предварительно пропускали азот.

Оптимальное время гидролиза выбирают исходя из предварительных опытов, в которых пробы обрабатывают HCl в течение различных периодов времени. Вначале количество гексозаминов увеличивается до максимума, а затем уменьшается в результате разрушения. Поправку на потери можно сделать добавлением в одну из проб известного количества гексозамина [17].

Сначала гидролизат высушивают в вакууме над NaOH для удаления HCl , а затем в эксикаторе над гранулированным NaOH . Добавляют воду и снова высушивают. Растворяют гидролизат в воде и пропускают через воронку с пористым стеклянным фильтром для удаления нерастворимых веществ. Отфильтрованный гидролизат помещают в колонку, изготовленную из пастеровской пипетки, заполненной 1 г ионообменной смолы дауэкс-50. Колонку промывают 15 мл воды, элюат выливают. Гексозамины элюируют 10 мл 2 н. HCl , элюат высушивают в вакуумном эксикаторе над гранулированным NaOH . Добавляют 2 мл воды и снова высушивают.

Во время сушки гидролизатов и элюирования из колонки под влиянием концентрированной HCl разрушается значительное количество мурамовой кислоты. Потери этого соединения могут быть различными, и поэтому при определении суммарных гексозаминов описанная методика часто дает заниженные результаты.

Высушенную фракцию гексозамина растворяют в 0,1 мл воды и определяют количество гексозаминов, как описано выше (разд. 17.2.6). Проведение гидролиза делает необязательными обработку 3 н. HCl и последующую нейтрализацию.

Применение методики

Очистка гексозаминов необходима при анализе сложных полимеров, отличных от пептидогликанов (например, липополисахаридов). Методику можно применять к целым бактериальным клеткам (помня о том, что выход мурамовой кислоты варьирует), а также для определения гексозаминов в культуральных средах.

17.2.8. Мурамовая кислота

Мурамовая кислота встречается только как компонент пептидогликанов клеточных стенок бактерий, в том числе цианобактерий. Она присутствует у всех прокариот, за исключением организмов, относящихся к архебактериям [9, 11, 14]. Содержание мурамовой кислоты в клеточной суспензии является показателем присутствия и количества пептидогликанов. Количественный анализ этого соединения используется для определения количества бактериальной биомассы в почвах и воде [10, 14].

Наиболее удобные и специфические способы определения мурамовой кислоты включают щелочную обработку кислотных гидролизатов клеточных стенок для удаления D-лактата из 3-го положения мурамовой кислоты. Затем проводят количественный анализ D-лактата ферментативным методом, описанным Типпером [17], согласно которому молочную кислоту определяют с помощью лактатдегидрогеназы, или же колориметрическим методом Хадзии [12].

Реактивы и оборудование

Раствор сульфата меди: 4 г CuSO_4 растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

n-Гидроксидифенильный реактив: 1,5 г *n*-гидроксидифенила растворяют в 95%-ном (объем/объем) этаноле.

Основной раствор мурамовой кислоты: мурамовую кислоту (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) растворяют в воде до концентрации 0,25 мг/мл. Мурамовая кислота содержит 30% по весу молочной кислоты, присоединенной эфирной связью.

20-мл пробирки, имеющие завинчивающиеся крышки с тефлоновыми прокладками.

Спектрофотометр или колориметр и стеклянные кюветы или пробирки для колориметра.

Вся стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта и ополоснута серной кислотой. После мытья нельзя допускать попадания на нее пыли и оставлять на ней отпечатки пальцев.

Методика

Пробы гидролизованного пептидогликана, содержащие от 5 до 50 мкг мурамовой кислоты, вносят в пробирки, имеющие завинчивающиеся крышки с тефлоновыми прокладками, и нейтрализуют равным объемом 4 н. NaOH. Готовят стандартные растворы, содержащие 1—10 мкг молочной кислоты в составе мурамовой кислоты, а также контрольную пробу с реактивом. Объем всех проб доводят до 1 мл дистиллированной водой. Добавляют еще 0,5 мл 1н. NaOH и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. Добавляют 10 мл серной кислоты, пробирки закрывают и нагревают 10 мин в кипящей воде. После охлаждения добавляют 0,1 мл сульфата меди и 0,2 мл *n*-гидроксифенильного реактива и быстро перемешивают с помощью встряхивателя Vortex. Пробирки инкубируют в водяной бане при 30 °С в течение 30 мин, после чего измеряют оптическую плотность при 560 нм. Концентрацию мурамовой кислоты определяют по стандартной калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью в стандартных пробах и концентрацией в них мурамовой кислоты.

Применение методики

Мы привели описание простого, быстрого, не требующего дорогих реактивов и приборов способа определения мурамовой кислоты в отсутствие молочной кислоты, образуемой бактериями в процессе метаболизма. Определению не мешают ни другие компоненты пептидогликана, ни уоновые кислоты и нейтральные сахара при их содержании в пробе до 250 мкг.

17.2.9. 2-Кето-3-дезоксиктановая кислота

2-Кето-3-дезоксиктановую кислоту (КДО) в липополисахаридах определяют по методу Вейсбаха и Хурвитца [18], модифицированному Осборном [13]. При

окислении периодатом КДО дает формилпировиноградную кислоту, которая, реагируя с тиобарбитуровой кислотой, образует хромофор с максимумом оптической плотности при 550 нм. Дезоксисахара, кроме 2-кето-3-дезоксисахарных кислот, образуют различные окрашенные продукты, имеющие максимум оптической плотности при длинах волн, которые находятся вне диапазона 545—550 нм.

Реактивы

Периодатный реактив: HIO_4 растворяют в 0,125 н. H_2SO_4 до концентрации 0,025 н.

Разбавленная серная кислота: 0,02 н. H_2SO_4 . (*Предостережение!* См. разд. 17.2.2.)

Раствор арсенита натрия: 0,2 н. арсенит натрия растворяют в 0,5 н. HCl . (*Предостережение!* Арсенит натрия ядовит. Следует избегать вдыхания порошка. После работы с реактивом необходимо хорошо вымыть руки. Нельзя насыщать раствор в пипетку ртом.)

Тиобарбитуровая кислота: готовят 0,3%-ный раствор в дистиллированной воде, pH 2.

Методика

Лиофилизированный полисахарид, содержащий от 0,01 до 0,25 мкмоль КДО, растворяют в 0,1 мл 0,02 н. H_2SO_4 и инкубируют при 100 °C в течение 20 мин для выделения КДО из полимера.

Образцы гидролизата разбавляют 0,2 н. H_2SO_4 до 5,2 мл. Добавляют 0,25 мл периодатного реактива, перемешивают и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. Добавляют 0,5 мл 0,2 н. раствора арсенита натрия. Инкубируют 2 мин при комнатной температуре и добавляют 2 мл 0,3%-ной тиобарбитуровой кислоты, pH 2. Перемешивают и инкубируют при 100 °C в течение 20 мин. Охлаждают и определяют оптическую плотность при 548 нм.

Величина оптической плотности 1 мкмоль КДО, измеренная в 1-см кювете, равна 19,0.

Применение методики

Описанная выше процедура применима для определения КДО в очищенных липополисахаридах или препаратах клеточной стенки.

17.2.10. Гептозы

Продукт, выделяющийся при нагревании гептозы с серной кислотой, реагирует с цистеингидрохлоридом, образуя вещество с интенсивной оранжевой окраской. Это вещество превращается в соединение розового цвета имеющее максимум оптической плотности при 505 нм [13].

Реактивы

Раствор серной кислоты: 6 частей концентрированной H_2SO_4 добавляют к 1 части воды. (*Предостережение!* См. разд. 17.2 2.)

Раствор цистеингидрохлорида: 0,3 г цистеингидрохлорида растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Методика

Пробы объемом 0,5 мл помещают в ледяную баню. Добавляют по 2,25 мл раствора серной кислоты. Пробирки с пробами встряхивают 3 мин в ледяной бане. Переносят в водяную баню с температурой $20^\circ C$ на 3 мин, а затем нагревают в кипящей воде в течение 10 мин. Охлаждают, добавляют по 0,05 мл раствора цистеингидрохлорида и хорошо перемешивают. Через 2 ч после добавления цистеингидрохлорида определяют оптическую плотность при 505 и 545 нм. Для настройки прибора на нуль при каждой длине волны используют контрольную пробу, содержащую все указанные реактивы, кроме цистеингидрохлорида.

Результат определяют по разности величин оптической плотности при 545 и 505 нм. 1 мкмоль L-глицеро-D-манногептозы в 1 мл при ширине кюветы 1 см имеет оптическую плотность 1,07.

Применение методики

Для обнаружения дезоксигексоз и дезоксипентоз можно применять методику, описанную Дише [7]. Приведенная здесь модифицированная методика Осборна [13] представляет собой довольно специфический способ определения гептоз в очищенных препаратах гликопротеинов и липополисахаридов.

17.3. ЛИПИДЫ

Липиды — это химически разнообразная группа биологических веществ, нерастворимых в воде, но растворяющихся в органических растворителях и содержащих обычно длинные углеводородные цепи. Это определение относится к углеводородам с длинными цепями, спиртам, альдегидам, жирным кислотам и их производным, включая глицериды, фосфолипиды, гликолипиды и сульфоллипиды.

К липидам часто относят стерины, жирнокислотные эфиры стеринов, витамины А, D, Е и К, каротиноиды и другие полиизопреноиды, поскольку они связаны с мембранами и могут экстрагироваться теми же растворителями, что и другие липиды. Обзор типов и строения липидов бактериальной клетки сделал О'Лири [21].

Липиды содержатся в плазматических мембранах всех живых клеток. Бактериальные мембраны устроены гораздо проще, чем мембраны эукариотических клеток. Однако известно, что бактерии содержат, кроме фосфолипидов, очень много разнообразных липидов. К ним относятся сфинголипиды, нейтральные липиды, гликолипиды и множество необычных липидов, присутствующих, например, у бактерий таких родов, как *Corynebacterium*, *Nocardia* и *Mycobacterium* [21]. Считалось, что прокариоты не содержат стеринов. Однако недавно было показано, что в бактериях присутствует сквален и множество различных стеринов [22, 28]. Грамотрицательные бактерии содержат в наружной мембране уникальные липиды в липополисахаридных комплексах [21]. В цитоплазме некоторых бактерий накапливается в больших количествах поли-β-гидроксимасляная кислота, служащая источником углерода и энергии.

Ввиду сложности состава бактериальных липидов описание способов суммарного анализа каждого их класса здесь невозможно. Варианты приведенных ниже методик, а также сложные способы более полного анализа бактериальных липидов можно найти в специальных статьях на эту тему [19, 20].

17.3.1. Неочищенные суммарные липиды

По сравнению с другими методиками способ экстракции суммарных неочищенных липидов, описанный Блаем и Дайером [23], занимает меньше времени и требует меньшего числа процедур. Эта методика широко используется в работе с бактериями. Клетки смешивают с хлороформом и метанолом, взятыми в количествах, при которых образуется монофазный раствор после смешивания с внутриклеточной водой [24]. При разбавлении суспензии клеток водой или хлороформом образуется двухфазный слой. Липиды остаются в хлороформной фазе, а нелипидные вещества — в метанольно-водной. Отделив хлороформный слой, можно выделить и очистить липиды, как описано ниже. Выход суммарных неочищенных липидов после отделения от нелипидных примесей должен быть выше 95%.

Хара и Радин [25] описали другую методику, не требующую применения хлороформа. Ее преимущество заключается в том, что в отличие от метода Блая и Дайера она позволяет заменить стадию фильтрования центрифугированием. Для экстракции липидов используется смесь гексана и изопропанола, а вещества нелипидной природы удаляются промыванием экстракта водным раствором сульфата натрия. Экстракт липидов можно фракционировать на колонках с силикагелем, используя гексан, изопропанол и водные смеси.

Реактивы и материалы

Абсолютный метанол и хлороформ. применяют чистые свежеперегнанные реактивы (х. ч.; analytical grade). (*Предостережение!* Хлороформ оказывает вредное действие на печень и является анестезирующим средством. Во избежание контакта с жидкостью или парами следует работать в вытяжном шкафу. Метанол очень легко воспламеняется и ядовит при попадании через рот.)

Фильтровальная бумага Whatman № 1.

Фарфоровая воронка Бюхнера диаметром 43 мм.

Колба Бюхнера на 125 мл.

Методика

Густую пасту из 5 г влажных клеток или 1 г лиофилизированных клеток и 4 мл дистиллированной воды смешивают с 5 мл хлороформа и 10 мл метанола в про-

бирке со стеклянной пробкой. Смесь встряхивают в течение 5 мин и оставляют при комнатной температуре на 3—4 ч, периодически встряхивая. Добавляют еще 5 мл хлороформа и 5 мл дистиллированной воды и встряхивают смесь при комнатной температуре в течение 30 мин.

Экстракт быстро фильтруют через фильтровальную бумагу Whatman № 1 под слабым вакуумом. Фильтрат переносят в стеклянный мерный цилиндр для разделения слоев.

Метанольно-водный слой полностью удаляют отсасыванием. Остаток клеточного материала вновь экстрагируют 5 мл хлороформа, фильтруют через бумагу Whatman № 1 и промывают фильтр 12,5 мл хлороформа. Фильтраты объединяют и добавляют к слою хлороформа, отделенного при первой экстракции.

Экстракты хлороформа помещают в доведенный до постоянного веса стеклянный или фарфоровый сосуд и выпаривают досуха под струей азота в водяной бане при 35—40 °C для получения сухого неочищенного суммарного препарата липидов. Все операции проводят в вытяжном шкафу.

Количество неочищенных суммарных липидов определяют с помощью аналитических весов.

17.3.2. Очищенные суммарные липиды [34]

Реактивы и материалы

Растворители: дважды перегнанный хлороформ (200 частей) и метанол (100 частей) смешивают с водой (75 частей). Энергично встряхивают в делительной воронке и оставляют для разделения на верхнюю (растворитель I) и нижнюю (растворитель II) фазы. Каждую фазу сливают отдельно и хранят при комнатной температуре. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Сефадекс G-25 мелкогранулированный (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, N. Y.).

Хроматографическая колонка размером 1×15 см с дном из пористого стекла и тефлоновым краном.

Методика

Принципы гель-фильтрации см. в разд. 16.3.7. 25 г сефадекса G-25 замачивают на ночь в 100 мл растворителя I. Растворитель над набухшими гранулами декантируют и промывают им же гранулы 4 раза.

Готовят густую суспензию из гранул в растворителе I (общий объем 50 мл) и дегазируют ее, поместив в сосуд под вакуумом на 10—15 мин. Суспензию изредка помешивают. Затем ее переливают в колонку, содержащую несколько миллилитров растворителя I. Продолжают добавлять суспензию до получения слоя сефадекса высотой 10 см. Создают давление $6,8 \cdot 10^3$ — $13,6 \cdot 10^3$ Па с помощью азота в баллоне для уплотнения слоя гранул сефадекса, на который затем помещают диск из стекловолокна. Колонку промывают 10 мл растворителя I и 10 мл растворителя II.

Растворяют 150—200 мг высушенной неочищенной фракции суммарных липидов в 2—5 мл растворителя II. Фильтруют полученный раствор через воронку с фильтром из пористого стекла прямо в колонку с сефадексом. Воронку промывают 2 мл растворителя II. Подают на колонку азот под давлением 13 — $20 \cdot 10^3$ Па, так чтобы скорость протекающего раствора была 0,5—1,0 мл/мин. Подключают к колонке растворитель II и собирают фракцию объемом 25 мл, прошедшую через колонку.

Элюат концентрируют при пониженном давлении и комнатной температуре до получения мутной водной эмульсии. Эмульсию лиофилизуют. Высушенные липиды растворяют в смеси хлороформа и метанола (2:1, по объему), переносят в сосуды с известным весом и выпаривают растворители в токе азота при 35—40 °С. Сушку завершают в вакуумном эксикаторе с парафиновой стружкой. После высушивания сосуд с сухим липидным экстрактом взвешивают.

Степень извлечения липидов на стадиях экстракции и очистки можно определить в контрольном эксперименте с использованием известных количеств очищенных суммарных липидов.

17.3.3. Классы липидов

Липиды могут связываться с твердым адсорбентом в хроматографической колонке. В качестве адсорбента чаще всего используют кремневую кислоту, окись алюминия и окись магния (разд. 16.3.2). Липиды связываются с помощью полярных, ионных и вандерваальсовых сил. Разделение осуществляют с использованием раство-

рителей увеличивающейся полярности, которые позволяют разделять липиды на классы, определяемые количеством и характером полярных групп в их молекулах [19, 20].

Описанный здесь метод основан на использовании обработанного кислотой флорисила. В качестве растворителей для элюирования адсорбированных липидов применяют хлороформ, смесь хлороформа и ацетона и метанол. Их выбор определяется простотой и воспроизводимостью методики, а также тем, что все фосфолипиды элюируются в одной фракции.

Реактивы и материалы

Флорисил, обработанный кислотой: смешивают 100 г флорисила (60—100 меш, Fisher Scientific Co.) с 350 мл концентрированной HCl в колбе Эрленмейера объемом 1 л и нагревают в течение 3 ч на кипящей водяной бане под тягой. (*Предостережение!* Следует избегать вдыхания паров HCl. Работая с сильными кислотами, необходимо соблюдать все меры предосторожности и не допускать попадания жидкости или паров на кожу или в глаза.) Надосадочную жидкость осторожно декантируют и промывают отстоявшийся сорбент 50 мл концентрированной HCl. Добавляют еще 350 мл концентрированной HCl и нагревают суспензию в течение 12—16 ч (или в течение ночи) в круглодонной колбе с обратным холодильником при 100 °C. Все операции выполняют очень осторожно в вытяжном шкафу, избегая вдыхания паров. HCl сливают и выбрасывают, находящийся в осадке адсорбент трижды промывают дистиллированной водой путем декантации, а затем — в воронке Бюхнера до нейтрализации промывных вод. Остаток высушивают вначале отсасыванием на воронке, а затем нагреванием флорисила при 120 °C в стеклянной чашке в течение ночи. Еще раз обрабатывают кислотой и промывают водой. Воду из адсорбента удаляют, отсасывая на воронке. Последовательно добавляют 150 мл метанола, 150 мл смеси метанол—хлороформ (1:1, по объему), 150 мл хлороформа и 150 мл эфира. Адсорбент высушивают в течение ночи при 120 °C в стеклянной чашке. (*Предостережение!* Эфир может взрываться при контакте с пламенем или раскаленными электрическими проводами. Его удаляют из адсорбента как можно полнее, и сушку проводят в вытяжном шкафу.)

Свежеперегнанный хлороформ. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Ацетон и метанол. (*Предостережение!* См. 17.3.1.)

Стеклянная хроматографическая колонка размером 1×30 см, снабженная емкостью для растворителя (делительной воронкой с тефлоновым краном), укрепляемой в верхней части колонки с помощью стеклянного шлифа 24/49, очищенного от смазки. В нижней части колонки должен находиться фильтр из пористого стекла или тампон из стекловаты, а также тефлоновый кран.

Методика

12 г обработанного кислотой флорисила суспендируют в дважды перегнанном хлороформе. Суспензию помещают в колбу или в эксикатор и дегазируют под вакуумом в течение 10 мин. Дегазированную суспензию переносят в хроматографическую колонку и дают возможность хлороформу вытекать из колонки до тех пор, пока его уровень не будет приблизительно на 1 мм превышать уровень адсорбента.

150—200 мг очищенных суммарных липидов (см. предыдущую методику) растворяют в 3 мл хлороформа. Раствор наносят на колонку и дают ему впитаться так, чтобы сверху почти не было жидкости. Добавляют еще 5 мл хлороформа и ждут, пока он весь войдет в колонку. Осторожно с помощью делительной воронки наносят на колонку 50 мл хлороформа, не разрушая поверхностного слоя адсорбента. Дают растворителю пройти через колонку, собирая элюат в коллекторный сосуд со скоростью, не превышающей 1 мл/мин. Когда хлороформ войдет в слой адсорбента, делительную воронку заполняют 60 мл смеси хлороформа и ацетона. Элюат собирают во второй коллекторный сосуд со скоростью, не превышающей 1 мл/мин. Когда эта смесь растворителей войдет в слой адсорбента, в воронку вносят 60 мл ацетона и собирают элюат в тот же сосуд. Затем наливают в воронку 60 мл метанола и собирают элюат в третий сосуд.

В первом коллекторном сосуде содержатся нейтральные липиды (углеводороды, каротиноиды, хлорофилл, стерины и эфиры стерина, глицериды, воска, спирты с длинными цепями и альдегиды) и жирные кислоты; во втором — гликолипиды, сульфолипиды, а иногда и некоторые фосфатиды, в третьем — фосфолипиды. Последние можно обнаружить и количественно определить с помощью реакции на органический фосфат (разд. 17.3.5).

17.3.4. Фракционирование фосфолипидов

Фракционирование фосфолипидов проводят с помощью тонкослойной хроматографии, используя множество различных систем растворителей и камер [19, 20, 31].

Реактивы и материалы

Стекланные пластинки размером 20×20 см, с толщиной слоя силикагеля 250 мкм. Можно приобрести готовые пластинки с силикагелем или приготовить самим, нанося силикагель на стекланные пластинки [20]. Пластинки ставят в камеру с дважды перегнанным ацетоном и пропускают последний до их верхнего края. Затем их высушивают на воздухе в вытяжном шкафу и нагревают при 110°C 30 мин, охлаждают в эксикаторе и используют в день приготовления.

Стекланные камеры, или сэндвич-камеры, для тонкослойной хроматографии можно приобрести у различных фирм. В камеры, предназначенные для большого числа пластинок за 2 ч до фракционирования наливают свежеприготовленный растворитель. Камеры выстилают фильтровальной бумагой, пропитанной растворителем, и герметично закрывают для создания равновесия.

Растворители. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Растворитель I: смесь хлороформа, метанола и воды (65 : 25 : 4; по объему), приготовленная из перегнанных растворителей.

Растворитель II: смесь хлороформа, метанола и 7 н. гидроксида аммония (60 : 35 : 5; по объему).

Азот: жидкий в сосуде Дьюара.

Микропипетки: на 50 мкл, градуированные с интервалом 5—10 мкл.

Методика

Высушенную фосфолипидную фракцию, полученную после разделения на колонке с флорисилом, растворяют в смеси хлороформа и метанола (1:1, по объему) до концентрации приблизительно 100 мг/мл). Объем раствора регистрируют. Измеренное количество каждого раствора наносят на хроматографическую пластинку в виде пятна диаметром 10 мм на расстоянии 2,5 см от нижнего и столько же от правого края. Пробу наносят с помощью градуированной пипетки на 50 мкл разового пользования. После каждого нанесения пятно сушат в токе азота. На одну пластинку наносят до 0,1 мл раствора. После высушивания в токе азота пластинку помещают в камеру с растворителем I. Камеру герметично закрывают и пропускают растворитель до тех пор, пока его фронт не достигнет верхнего края пластинки (обычно 1—2 ч). Пластинку вынимают и высушивают на воздухе, поворачивают на 90° по часовой стрелке по отношению к направлению первого растворителя и переносят в другую камеру с растворителем II. Этот раство-

ритель пропускают во втором направлении и затем высушивают пластинку на воздухе.

Хроматограмму окрашивают парами йода, как описано ниже, для обнаружения пятен фосфолипидов. Ее слегка увлажняют над водяным паром и снимают силикагель в каждом пятне лезвием бритвы. Снятый силикагель переносят в отдельную пастеровскую пипетку с тампоном из стекловолокна в суженном ее конце. По пипетке слегка постукивают до тех пор, пока силикагель не осядет в виде слоя на тампоне из стекловаты. Такую колонку из силикагеля промывают 2 мл смеси хлороформ — метанол (1:1, по объему), а затем 2 мл метанола для элюирования фосфолипидов. Элюаты собирают в пробирки со стеклянными пробками. Каждый фосфолипид разливают поровну в две 15-мл пробирки со стеклянными пробками и в ампулу для лиофилизации и в дальнейшем анализируют. Растворители выпаривают при 37°C в токе азота. Одна пробирка предназначена для анализа на суммарный органический фосфор с целью определения количества каждого присутствующего фосфолипида. Две другие пробы можно подвергнуть кислотному или щелочному гидролизу с последующей идентификацией веществ для установления их возможной структуры.

Окраска иодом для обнаружения липидов на хроматограммах [19, 20]

В хроматографическую камеру помещают кристаллы йода, закрывают ее и нагревают на водяной бане при 60°C для выпаривания йода. (*Предостережение!* Пары йода раздражают кожу. Они очень ядовиты и могут вызывать ожоги. Необходимо избегать попадания кристаллов йода на кожу и вдыхания паров. Все операции должны проводиться под тягой.) Хроматограммы помещают в камеру со стеклянными подставками, удерживающими их на расстоянии 2,5 см от дна камеры. Камеру закрывают на 1 мин, затем вынимают хроматограммы и рассматривают при дневном свете и под ультрафиолетовой лампой (365 нм). (*Предостережение!* УФ-свет может вызывать сильные ожоги глаз. При работе с ним следует надевать защитные очки.) Липиды

видны в виде коричневых пятен при дневном свете и очень темных пятен — под УФ-лампой. Пятна обводят карандашом, до того как окраска начнет исчезать.

17.3.5. Определение фосфата в фосфолипидах

Количество фосфата в каждой фосфолипидной фракции, полученной с помощью тонкослойной хроматографии, можно определить по методике Бартлета, описанной Кейтсом [20].

Реактивы и материалы

Прозрачные пирексовые пробирки размером 13×100 мм промывают в горячей 1 н. азотной кислоте в течение 1 ч и прополаскивают дистиллированной водой. Вся стеклянная посуда должна быть тщательно очищена от следов моющих средств и других источников загрязнения фосфором. (*Предостережение!* При работе с горячей азотной кислотой необходимо надевать резиновые перчатки, защитную одежду и очки. Все операции следует выполнять под тягой.)

Промытые кислотой стеклянные шарики обрабатывают вместе с пробирками, как описано выше.

Хлорная кислота: 72%-ный (объем/объем) раствор в дистиллированной воде. (*Предостережение!* Хлорная кислота и ее пары вызывают ожоги. При работе с ней необходимо надевать защитную одежду, перчатки и очки. Если в присутствии хлорной кислоты и окисляющих веществ нагревать раствор до 150°C , может произойти пожар или взрыв.)

Молибдат аммония: 5%-ный раствор (вес/объем) в дистиллированной воде.

Амидол: 0,5 г 2,4-диаминфенолдигидрохлорида добавляют к 50 мл 20%-ного (вес/объем) бисульфита натрия и раствор фильтруют.

Фосфорный стандарт (10 мкг фосфора/мл): растворяют 1,097 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ в 250 мл дистиллированной воды. Полученный раствор разбавляют 1:10 дистиллированной водой до концентрации фосфора 10 мкг/мл.

Методика

Известное количество липидов вносят в пробирку и выпаривают растворитель в токе профильтрованного воздуха или азота при 40°C . Фосфорные стандарты, содержащие 1—10 мкг фосфора в 1 мл (0,1—1,0 мл стан-

дартного раствора), высушивают таким же образом. Добавляют 0,4 мл 72%-ной хлорной кислоты и закрывают пробирки промытыми кислотой стеклянными шариками. Нагревают при 100 °С до тех пор, пока раствор не станет прозрачным и бесцветным. Работают в вытяжном шкафу, приспособленном для процедур с хлорной кислотой. Добавляют 4,2 мл дистиллированной воды, 0,2 мл раствора молибдата аммония и 0,2 мл амидола. Перемешивают и закрывают каждую пробирку стеклянным шариком. Пробирки нагревают 7 мин в кипящей водяной бане. Быстро охлаждают их и через 15 мин измеряют оптическую плотность при 830 нм (разд. 16.1.1). Для настройки спектрофотометра на нуль используют контрольную пробу без фосфата. Концентрацию фосфата в каждой пробе определяют по стандартной калибровочной кривой, отражающей зависимость между концентрацией фосфата в стандартных пробах и оптической плотностью в них. Эта зависимость имеет линейный характер до концентрации фосфата 10 мкг/мл. Суммарное содержание фосфата в фосфолипидах можно выразить в микромолях каждого фосфолипида, допустив, что все они содержат по одной фосфатной группе.

17.3.6. Идентификация фосфолипидов [19, 20, 31]

Фосфолипиды можно деацилировать путем слабого щелочного гидролиза, приводящего к образованию водорастворимых глицерофосфатов и жирных кислот, растворимых в органических растворителях. Глицерофосфаты идентифицируют в специальных реакциях с образованием окрашенных продуктов по значениям R_f , определенным с помощью хроматографии на бумаге [21]. Жирные кислоты лучше всего идентифицировать с помощью газожидкостной хроматографии метиловых эфиров (разд. 16.3.4).

Дополнительное подтверждение результатов идентификации фосфолипидов можно получить, анализируя свободные основания, образующиеся при кислотном гидролизе. Их определяют по значениям R_f и результатам окрашивания после разделения на бумажных хроматограммах [19, 31].

Реактивы и материалы

Раствор гидроксида натрия в метаноле (0,2 н.): 0,4 г NaOH растворяют в 50 мл метанола. Используют свежеприготовленный раствор. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Раствор гидроксида аммония в метаноле (1,5 н.): 10 мл концентрированного гидроксида аммония разбавляют метанолом до 100 мл. (*Предостережение!* Гидроксид аммония (пары и жидкость) — едкая щелочь. Все операции при работе с ним необходимо выполнять в вытяжном шкафу, надевая защитные перчатки, одежду и очки.)

Гидроксид натрия (1,25 н.).

Хлороформ. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Метанол. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Катионообменная смола: Bio-Rad AG 50W×8, дауэкс-50 (H⁺), амберлит IR-100 (H⁺) или другие смолы подобного типа.

Соляная кислота (1 н.).

Водонасыщенный фенол: равные объемы дважды перегнанного жидкого фенола и воды наливают в плотно закрывающуюся бутылку, встряхивают и сливают слой фенола. Водонасыщенный фенол хранят в склянке из темного стекла при 4 °С. Для каждого опыта его готовят заново из дважды перегнанного фенола, хранящегося при —20 °С. (*Предостережение!* Фенол вызывает сильные ожоги. При работе с ним нужно надевать защитные перчатки, одежду и очки, а переноску необходимо проводить в вытяжном шкафу.)

Смесь метанола и воды (10 : 9; по объему).

Этанол абсолютный (ч. д. а.; reagent grade).

Уксусная кислота ледяная (ч. д. а.; reagent grade).

Гексан, чистый для спектрофотометрии (Merk and Co., Inc., Rahway, N. Y.).

Пробирки на 15 мл со стеклянными пробками.

Хроматографическая бумага Whatman № 1; размер бумаги зависит от величины хроматографической камеры.

Камера для нисходящей бумажной хроматографии.

Ампулы для лиофилизации на 10 мл.

Лиофилизатор или вакуумный испаритель.

Стандарты фосфолипидов: фосфатидилхолин (дистеариловый эфир), фосфатидилсерин из бычьего мозга, фосфатидилэтаноламин из *E. coli*, фосфатидил-N,N-диметилэтаноламин (дипальмитоилловый эфир), фосфатидилглицерин (кардиолипин) из бычьего сердца.

Реактив Драгендорфа для опрыскивания: 1,7 г нитрата висмута растворяют в 100 мл 20%-ной уксусной кислоты. 10 г иодида калия растворяют в 25 мл воды. Непосредственно перед использованием смешивают 5 мл раствора иодида калия, 20 мл раствора нитрата висмута и 70 мл воды. Эту смесь применяют для опрыскивания.

Раствор нингидрина: 0,25 г нингидрина (ч. д. а.; reagent grade) растворяют в 100 мл смеси ацетона и лютидена (2,6-диметилпиридина; 9:1, по объему). Используют свежеприготовленный реактив. (*Осторожно!* Нингидрин может вызывать аллергическую реакцию.)

Методика

Кислотный гидролиз фосфолипидов и идентификация свободных оснований. В ампулу для лиофилизации, где уже находится фракция очищенных фосфолипидов, полученная в результате разделения с помощью тонкослойной хроматографии (разд. 17.3.4), вносят 2 мл 1 н. HCl. Ампулу запаивают и нагревают при 100 °С в течение 4 ч. Затем ее охлаждают и открывают. Содержимое ампулы переносят в 10-мл пробирку с завинчивающейся пробкой и добавляют к нему 2 мл дважды перегнанного гексана. Перемешивают с помощью встряхивателя Vortex и оставляют на некоторое время для разделения фаз. Удаляют водный слой и лиофилизируют или высушивают его в испарителе.

Остаток растворяют в 0,1 мл дистиллированной воды. На хроматографическую бумагу Whatman № 1 наносят отдельно каждую пробу в виде пятна диаметром 10 мм и проводят фракционирование методом нисходящей хроматографии, используя систему растворителей фенол—этанол—уксусная кислота (50:5:6; по объему). В качестве стандартов для хроматографирования и идентификации свободных оснований используют аналогично обработанные известные фосфолипиды или холин, этаноламин, серин и N,N-диметилэтаноламин [19].

После пропускания растворителя хроматограмму сушат в течение ночи в вытяжном шкафу и затем разрезают на полоски. Одну полоску, содержащую стандарт или неизвестное вещество, опрыскивают нингидрином, а другую (с тем же неизвестным веществом или стандартом) — реактивом Драгендорфа. Серин и этаноламин после обработки нингидрином проявляются в виде синих пятен с значениями R_f около 0,27 и 0,51 соответственно. Холин и N,N-диметилэтаноламин не реагируют с нингидрином. Реактив Драгендорфа окрашивает холин в оранжевый цвет, а диметилэтаноламин — в бледно-оранжевый. Значения R_f для холина и N,N-диметилэтанолamina составляют ~0,93 и 0,86 соответственно.

Щелочной гидролиз фосфолипидов и определение глицерофосфатов [19, 20]. К 1—5 мг фосфолипидов, полученных хроматографией на флорисиле (разд. 17.3.3), добавляют 0,2 мл хлороформа, 0,3 мл метанола и 0,5 мл

метанольного раствора гидроксида натрия. Смесь перемешивают в пробирке со стеклянной пробкой с помощью встряхивателя Vortex и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

Добавляют 1,9 мл смеси хлороформ — метанол — 1,25 н. NaOH (1:4:4,5; по объему), переносят в коническую центрифужную пробирку, перемешивают смесь с помощью встряхивателя Vortex и центрифугируют 1 мин при 600 g. Верхний слой метанольно-водного слоя удаляют пастеровской пипеткой. Добавляют к нему катионообменную смолу, энергично встряхивая до тех пор, пока pH, измеренный с помощью индикаторной бумаги, не станет равным 5—6. Пробу центрифугируют и отделяют жидкость от смолы с помощью пастеровской пипетки. Добавляют 1—2 капли метанольного раствора гидроксида аммония для того, чтобы раствор стал слегка щелочным (pH 7,5—9,0). pH определяют с помощью индикаторной бумаги. Жидкость выпаривают досуха в токе азота при 30 °C и остаток растворяют в 0,1 мл смеси метанола и воды (10:9; по объему).

Растворенные глицерофосфаты идентифицируют совместной хроматографией с продуктами, образующимися после аналогичной обработки известных фосфолипидов [19]. Для этого три аликвоты каждой пробы по 25 мкл каждая наносят на бумагу Whatman № 1 на расстоянии 10 см друг от друга и ставят нисходящую хроматограмму в системе фенол — этанол — уксусная кислота (50:5:6). После пропускания растворителя хроматограмму высушивают в течение ночи в вытяжном шкафу и режут на полоски. Одну из полосок, содержащую глицерофосфат, опрыскивают реактивом Драгендорфа, другую опрыскивают нингидрином, а третью — реактивом Форбека и Маринетти, состоящим из смеси салицилсульфоновая кислота — трихлорид железа [33] (см. ниже). Фосфатидилэтаноламин ($R_f=0,66$) и фосфатидилсерин ($R_f=0,28$) после опрыскивания нингидрином и выдерживания в течение нескольких часов при комнатной температуре дают розовато-лиловые пятна. Фосфатидилхолин ($R_f=0,86$) и фосфатидилэтаноламин ($R_f=0,80$) после обработки реактивом Драгендорфа проявляются в виде оранжевых и бледно-оранжевых пятен соответственно и не дают никакой окраски с нин-

гидрином. Все реакции с реактивом салицилсульфоно-вая кислота — трихлорид железа описаны ниже.

Определение глицерофосфатов на хроматограммах при помощи реактива салицилсульфоно-вая кислота — трихлорид железа [19].

Растворяют 1,5 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 30 мл 0,3 н. HCl и разбавляют 90 мл ацетона. Погружают в этот реактив полоски бумаги, вырезанные из хроматограмм, сушат в вытяжном шкафу и затем вновь погружают в раствор, приготовленный растворением 1,5 г салицилсульфоно-вой кислоты в 100 мл ацетона. Глицерофосфаты проявляются в виде белых пятен на розовато-лиловом фоне.

17.3.7. Жирные кислоты

Одним из наиболее широко распространенных методов определения жирных кислот в бактериальных клетках является газожидкостная хроматография их метиловых эфиров, полученных из фосфолипидов, суммарных липидов и других липидных фракций. Метанолиз липидов происходит при нагревании их в смеси серной кислоты и метанола. Метиловые эфиры экстрагируют гексаном, после чего каждую из жирных кислот количественно измеряют с помощью газохроматографического прибора, снабженного подходящей колонкой (разд. 16.3.4).

Для получения метиловых эфиров жирных кислот используют несколько методик. Одна из них, отличающаяся простотой и удобством, описана ниже. В ссылках на литературу можно найти и другие методики, известные к настоящему времени [26, 32].

Реактивы и материалы

Газовый хроматограф, снабженный пламенно-ионизационным детектором и соответствующей электронной системой для регистрации. Существует несколько вариантов выбора хроматографических колонок и программ температурных режимов. При выборе газохроматографической методики, пригодной для данного прибора и анализируемого материала, исследователь может воспользоваться рекомендациями, содержащимися в работах [20, 26, 29, 30, 32].

n-Гексан, спектрально чистый (Merk and Co., Inc., Rahway, N. J.).

5%-ный раствор серной кислоты в метаноле: добавляют 5 мл (ч. д. а.; reagent grade) серной кислоты к 95 мл безводного метанола. Перед использованием каждый раз готовят свежий раствор. (*Предостережение!* См. разд. 17.2.1 и 17.3.1.)

Стандарты. Метилловые эфиры, в состав которых входят жирные кислоты C_{13} — C_{20} с прямыми и разветвленными цепями (Larodan Lipids, Malmö, Sweden, или Applied Science Laboratories, State College, Pa.).

Пирексовые пробирки на 15 мл со стеклянными пробками.

Методика

Вносят от 0,5 до 1 мг очищенных суммарных липидов (разд. 17.4.2) в пробирку со стеклянной пробкой и упаривают растворитель в токе азота при 30—37°C. К высушенным липидам добавляют 4 мл 5%-ного (вес/объем) раствора серной кислоты в метаноле и нагревают 2 ч при 70°C. После охлаждения добавляют 4 мл *n*-гексана и встряхивают пробирку 10 мин. Отделяют гексановый слой. Повторно экстрагируют метанольный слой 4 мл гексана. Для газохроматографического анализа используют объединенные гексановые экстракты (разд. 16.3.4). Метилловые эфиры жирных кислот идентифицируют, сравнивая их времена удерживания с временами удерживания известных жирных кислот. Количественное определение проводят путем сравнения площадей пиков с площадью пика внутреннего стандарта, внесенного в каждую пробу [26].

17.3.8. Поли-β-гидроксibuтират [27]

Поли-β-гидроксibuтират хотя и является липидом, однако не экстрагируется из бактериальных клеток растворителями, обычно используемыми для экстракции липидов. По методике, описанной Лоу и Слепеки [27], поли-β-гидроксibuтират экстрагируется горячим хлороформом из клеток, предварительно обработанных гипохлоритом для удаления мешающих веществ. В результате гидролиза образуется β-гидроксимасляная кислота, которая в концентрированной серной кислоте дегидратируется и превращается в кротоновую кислоту. Кротоновая кислота поглощает УФ-свет с максимумом оптической плотности при 235 нм, обусловленном двойной связью.

Реактивы и материалы

Раствор гипохлорита натрия: имеющийся в продаже раствор хлорной извести, например клорокс, или другая хлорная известь.

Кюветы: 1-см кюветы, изготовленные из кварца или другого материала, пропускающего УФ-свет.

Спектрофотометр для измерения поглощения в ультрафиолете.

Полипропиленовые или стеклянные центрифужные пробирки размером 12×100 мм на 30 мл. Пластмассовые центрифужные пробирки нужно мыть горячим хлороформом и этанолом для удаления пластификаторов. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Центрифуга с охлаждением (скорость до 10 000 g).

Пирексовые термостойкие пробирки.

Мерная колба на 10 мл.

Баня с кипящей водой.

Серная кислота (ч. д. а.; reagent grade). Качество серной кислоты имеет большое значение. Низкие сорта содержат вещества, поглощающие ультрафиолет, из-за чего контрольные (слепые) пробы имеют высокую оптическую плотность. (*Предостережение!* См. разд. 17.2.2.)

Стандарт: 3-гидроксимасляную кислоту (0,5 мг/мл) растворяют в этаноле (1:10) для получения раствора с концентрацией 50 мкг/мл.

Методика

Центрифугируют в течение 15 мин при 10 000 g (4°C) такой объем культуры, в котором содержится 10—20 мг (сухого веса) бактериальных клеток. Сухой вес определяют, взвешивая высушенные клетки из равного объема культуры (разд. 25.2.2). Добавляют гипохлорит натрия в количестве, равном первоначальному объему культуры, переносят суспензию в центрифужную пробирку, инкубируют в течение 1 ч при 37°C и затем центрифугируют 15 мин при 10 000 g для осаждения гранул липидов. Температура, при которой проводится центрифугирование, не имеет значения. Осадок суспендируют в воде и центрифугируют при 10 000 g в течение 15 мин. Надосадочную фракцию отбрасывают, а гранулы липидов, прилипшие к стенкам центрифужной пробирки, промывают сначала 5 мл ацетона, а потом 5 мл этанола. Это делают с целью удаления воды. В завершение липидные гранулы суспендируют в 5 мл ацетона с помощью встряхивателя Vortex и центрифугируют 15 мин при 10 000 g. Осадок суспендируют в 5 мл этанола, используя встряхиватель Vortex, и вновь центрифугируют 15 мин при 10 000 g.

Промытые гранулы растворяют в 3 мл кипящего хлороформа и инкубируют в кипящей бане в течение 2 мин. Раствор охлаждают и центрифугируют 15 мин при 10 000 g при комнатной температуре. Надосадочную фракцию переливают в 10-мл мерную колбу, а осадок дважды экстрагируют 3 мл хлороформа в течение 2 мин при 100°C. Если раствор непрозрачный, его фильтруют горячим через фильтровальную бумагу Whatman № 1 (предварительно промытую горячим хлороформом). Хлороформные экстракты объединяют и доводят хлороформом до 10 мл. Все операции с хлороформом выполняют в вытяжном шкафу. (*Предостережение!* См. разд. 17.3.1.)

Пробы хлороформного экстракта, содержащие от 5 до 50 мкг полимера и 5—10 стандартных растворов, в состав которых входит от 5 до 50 мкг β -гидроксимасляной кислоты в этаноле, вносят в стеклянные термостойкие пробирки. Пробирки погружают в кипящую водяную баню до выпаривания растворителей. Добавляют по 10 мл серной кислоты, закрывают пробирки стеклянными шариками и нагревают в кипящей водяной бане 10 мин. Растворы охлаждают и тщательно перемешивают.

Измеряют оптическую плотность растворов при 235 нм, используя в качестве контроля серную кислоту (разд. 16.1.1). Количество β -гидроксibuтирата определяют по калибровочной кривой. Количество поли- β -гидроксibuтирата на 1 г сухого веса биомассы бактерий рассчитывают исходя из сухого веса клеток в культуре.

Применение методики

Описанная выше методика подходит для определения количества поли- β -гидроксibuтирата в лиофилизированных клетках или в биомассе, полученной при центрифугировании. Определению мешают другие β -гидроксикислоты и некоторые сахара, так как они превращаются в вещества, поглощающие УФ-свет при 235 нм. Сахара удаляют обработкой гипохлоритом с последующей экстракцией поли- β -гидроксibuтирата хлороформом. Другие клеточные вещества также иногда образуют продукты, поглощающие УФ-свет. Рекомендуется сравнивать спектр поглощения вещества, образуемого бактериальными

ми клетками, со спектром поглощения стандарта для того, чтобы убедиться, что поглощение обусловлено кротоновой кислотой (разд. 16.1.1).

17.4. ПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ

Химические и структурные различия клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий весьма значительны. У грамположительных бактерий пептидогликаны могут составлять 40—90% веса выделенных клеточных стенок (15—20% веса сухих клеток), у грамотрицательных — менее 10%, а у некоторых псевдомонад — всего 1,2% [35—38, 44, 45, 58]. Этот полимер контролирует форму прокариот, за исключением микоплазм, галобактерий, метанобразующих бактерий и других видов, относящихся к архебактериям [49]. Пептидогликан большинства бактерий имеет основную цепь, состоящую из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, связанных β (1→4)-гликозидными связями. Небольшие отклонения от этой структуры наблюдаются у некоторых видов *Streptomyces* [38], у которых имеется N-гликоилмурамовая кислота. В кортексе эндоспор бактерий найден модифицированный пептидогликан, содержащий мурамиловый лактам [55].

Тетрапептид присоединяется к карбоксильной группе 3-O-D-молочной кислоты, связанной с остатками N-ацетилмурамовой кислоты. Порядок расположения аминокислот в тетрапептиде чаще всего следующий: L-аланин, D-глутаминовая кислота, диаминовая кислота и концевой D-аланин. К диаминовым кислотам в составе тетрапептида относятся мезо- и LL-диаминопимелиновая кислота, L-лизин, L-орнитин и L-диаминомасляная кислота. Эти и некоторые другие отклонения в структуре тетрапептида рассматриваются в работах Гуйзена [40], Роджерса и др. [45] и Камминса [38].

Тетрапептидные цепи поперечно связаны друг с другом. Количество и природа поперечных связей у различных организмов различны. Это может быть прямая пептидная связь между двухосновной аминокислотой в одном тетрапептиде и D-аланином другого тетрапептида

или соединение двух тетрапептидов посредством одной или нескольких аминокислот [36, 38, 45, 48].

Наличие N-ацетилмурамовой кислоты только в пептидогликане позволяет определять присутствие этого полимера в бактериальных клетках, а также проводить количественный анализ микробной биомассы в пробах почвы и воды. Диаминопимелиновая кислота обнаружена в макромолекулах только как компонент пептидогликана, поэтому положительные пробы на это соединение означают присутствие пептидогликана. Однако не все пептидогликаны содержат эту диаминокислоту [38].

Клеточные стенки грамположительных бактерий часто содержат также тейхоевые и тейхуроновые кислоты, белки и липотейхоевые кислоты. Тейхоевые кислоты — это сложные полимеры полиолов (рибита и глицерина), связанные в основной цепи фосфодиэфирными связями. Описаны некоторые отклонения в структуре основной цепи этих полимеров [38, 47]. Тейхоевые кислоты составляют 50% клеточной стенки некоторых грамположительных бактерий. Они являются хорошими антигенами, их серологическая реактивность используется для определения антигенных групп некоторых родов бактерий [47]. Тейхоевые кислоты клеточных стенок ковалентно связаны с пептидогликаном. Тейхоевые кислоты типа полимерных глицерофосфатов, называемые липотейхоевыми кислотами, ковалентно связаны с гликолипидами. Они обнаружены в плазматической мембране после разрушения клеток. Наиболее распространенные антигенные детерминанты — это сахара или аминосахара, присоединенные через гидроксильные группы к полиолам основной цепи. Часто бывает связан с полиолами аланин.

Тейхуроновые кислоты представляют собой кислые полисахариды, которые содержат уроновые кислоты, но не содержат фосфаты. Полимеры глюкуроновой кислоты с N-ацетилглюкозамином и полимеры аминоманнуровой кислоты с глюкозой встречаются у *Bacillus licheniformis* и *Micrococcus lysodeikticus* соответственно. Другие полимеры уроновой кислоты были обнаружены в качестве компонентов клеточной стенки у ряда грамположительных бактерий [38].

Полисахариды клеточной стенки и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, в частности

стрептококков, определяют антигенные различия, позволяющие разделять эти бактерии на серологические группы [38]. Полисахариды клеточных стенок других грамположительных бактерий образуют неоднородную группу макромолекул, состоящую обычно из нейтральных сахаров и иногда аминсахаров. Эти полисахариды имеют значение при дифференциации штаммов и видов, особенно в случае присутствия необычных или редко встречающихся сахаров.

Белки широко распространены как компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий. Поверхностные антигены стрептококков содержат различные кислоторастворимые белки [38].

Клеточные стенки у грамотрицательных бактерий намного сложнее, чем у грамположительных. Содержание пептидогликана в них значительно ниже, а у энтеробактерий пептидогликан ковалентно связан с липопротеинами, которые, вероятно, образуют связь между пептидогликаном и наружной мембраной клеточной стенки. Наружный мембранный слой богат липополисахаридами.

Липополисахариды — это чрезвычайно сложные молекулы с мол. массой выше 10 000 [35, 36, 39, 41, 44, 54, 57]. Липополисахариды *Salmonella* spp. состоят из трех частей: липидной, полисахаридного остова и О-полисахарида. Липидная часть, которую называют липидом А, содержит фосфорилованный дисахарид глюкозамин, сильно этерифицированный по гидроксильным и аминок группам жирными кислотами с 10—22 углеродными атомами в цепи. Основной жирнокислотный компонент фракции липида А — β -гидроксимиристиновая кислота, присущая только липидной части молекулы липополисахарида.

Полисахаридный остов связывает липид А и О-полисахарид. Он состоит из четырех основных сахаров, 2-кето-3-дезоксиктановой кислоты, фосфата и этаноламина. 2-Кето-3-дезоксиктановая кислота присутствует только в этой части молекулы липополисахарида.

Полисахаридный остов *Salmonella typhimurium* содержит следующие сахара: глюкозу, галактозу, гептозу и глюкозамин [35, 57]. Он ковалентно связан вторым углеродным атомом 2-кето-3-дезоксиктановой кислоты

со вторым углеродным атомом глюкозаминового остатка липида А. Полисахаридный остов ковалентно связан также с варьируемыми О-полисахаридными цепями. Несколько полисахаридных субъединиц могут быть связаны друг с другом пирофосфатными связями в липидной части молекулы. Липид А встроен в наружную мембрану таким образом, что О-полисахариды выступают наружу [35, 36]. О-Полисахариды являются главными антигенными детерминантами (О-антигеном) поверхности грамотрицательных бактерий. Они часто служат рецепторами для бактериофагов.

Тонкая структура и состав наружной мембраны грамотрицательных бактерий позволяют предполагать, что она представляет собой двойной слой, содержащий фосфолипиды и белки с различными количествами липополисахарида. Наружная мембрана ограничивает периплазматическое пространство — содержащий ферменты компартмент, связанный плазматической мембраной с внутренней частью клетки [35, 36].

Некоторые грамотрицательные клетки имеют наружную белковую или толстую полисахаридную оболочку, которая расположена снаружи от липополисахаридной зоны, выступающей из наружной мембраны [35, 36].

Было бы нецелесообразно описывать здесь все методы выделения и определения характеристик структурных компонентов клеточных стенок. Выбор метода зависит от исследуемого организма, имеющихся возможностей и целей исследования. Для одних исследований не требуются интактные высокоочищенные полимеры, для других, наоборот, необходимы и нативные, и чистые макромолекулярные вещества. Тот, кто хочет всесторонне охарактеризовать один из рассмотренных здесь полимеров бактерий, прежде всего должен ознакомиться с литературой, в которой описаны различные методы выделения, а также преимущества и ограничения каждого из них [35, 36, 57, 58]. Здесь даны самые простые методы выделения и получения предварительных характеристик пептидогликанов и липополисахаридов из наиболее распространенных в лабораторных исследованиях бактерий.

17.4.1. Пептидогликаны

Реактивы и оборудование

Физиологический раствор: 0,9%-ный (вес/объем) раствор NaCl в дистиллированной воде

Ферментный препарат: кристаллический трипсин

Трис-буфер: 1,21 г триса растворяют в 90 мл дистиллированной воды. Доводят pH до 7 с помощью 5 н. HCl и разбавляют водой до 100 мл

Дезоксирибонуклеаза: 5 мг сухого порошка фермента растворяют в 1,0 мл трис-буфера

Рибонуклеаза: 5 мг сухого порошка фермента растворяют в 1 мл трис-буфера

Центрифуга с охлаждением (максимальная скорость 22 000 g)

Толстостенные стеклянные (пирексовые) центрифужные пробирки на 50 мл

Центрифужные стаканы (100—250 мл) и соответствующие ротаторы. (*Предостережение!* Тонкостенные пирексовые стеклянные пробирки не выдерживают скорости 22 000 g.)

Ультразвуковой дезинтегратор, пресс Френча или механическая мельница

Методика

Бактериальные клетки охлаждают в ростовой среде до 4 °C льдом и собирают центрифугированием в 100—250-мл стаканах (5000 g, 15 мин). Клетки ресуспендируют в 20 мл охлажденного физиологического раствора и снова центрифугируют. Осажденные клетки используют сразу же или лиофилизируют их и хранят в морозильнике для предотвращения автолиза. Готовят однородную суспензию клеток в 20 мл холодной воды. Лиофилизованные клетки суспендируют в несколько этапов: сначала делают густую кашу из клеток, медленно добавляя воду и постоянно помешивая образующуюся суспензию. Клетки перемешивают механическим способом или с помощью ручного гомогенизатора до полного диспергирования. При отсутствии механического гомогенизатора можно сделать то же самое путем всасывания и выдувания суспензии через пипетку с ватным тампоном. Суспензию хранят на холоду для предотвращения автолиза клеточных стенок в течение всех процедур.

Клетки разрушают с помощью ультразвукового дезинтегратора, механической мельницы или прессы Френча (разд. 5.1). Сразу же после разрушения суспензию

клеток нагревают до 75°C. Эту температуру поддерживают в течение 15 мин для инактивации автолитических ферментов. Неразрушенные клетки удаляют центрифугированием при низкой скорости (1000 g, 15 мин). Осадок отбрасывают, а надосадочную фракцию центрифугируют в 30-мл центрифужных пробирках при 22 000 g в течение 15 мин. При этом под полупрозрачным слоем клеточных стенок должен образоваться тонкий мутный слой неразрушенных клеток. Верхний слой отбирают, а осадок осторожно промывают охлажденным 0,1 М трис-буфером, рН 7, с помощью пастеровской пипетки. Когда объем верхнего слоя достигнет 15 мл, его вновь центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, а надосадочную фракцию центрифугируют 15 мин при 22 000 g. Верхний слой ресуспендируют в трис-буфере. Эти операции повторяют до тех пор, пока не получат гомогенную фракцию клеточных стенок, не содержащую интактных клеток.

Фракцию клеточных стенок суспендируют в 100 мл насыщенного хлороформом трис-буфера. Добавляют дезоксирибонуклеазу (0,5 мл раствора с концентрацией 1 мг/мл) и рибонуклеазу (1,0 мл раствора с концентрацией 5 мг/мл) и инкубируют суспензию при 37°C 30 мин. Добавляют 100 мкг кристаллического трипсина и продолжают инкубацию при той же температуре еще 6 ч. Клеточные стенки осаждают центрифугированием и промывают, как описано выше. Осаждение и промывание повторяют до получения гомогенного слоя. Для удаления денатурированных белков добавляют трипсин. Этот фермент вызывает автолиз пептидогликана некоторых бактерий. В этом случае при центрифугировании осадка не образуется. Если это наблюдается, обработку трипсином проводить не следует. Выделение пептидогликана из большинства грамотрицательных бактерий требует большого количества клеточного материала (20—30 г) из-за низкого содержания этого полимера в бактериях и его повышенной чувствительности к автолизу. Методика получения 150 мг пептидогликана из клеток *E. coli* описана Вейделем и др. [56].

Содержание гексозамина и мурамовой кислоты определяют после кислотного гидролиза очищенных клеточ-

ных стенок (разд. 17.2.7 и 17.2.8). Аминокислоты определяют с помощью аминокислотного анализатора или бумажной хроматографии [58]. Наличие нескольких аминокислот означает загрязнение белками мембран, клеточной стенки или цитоплазмы.

В работах Коттела и др. [51] и Гуйзена и др. [48] продемонстрированы хорошие примеры того, как можно получить исчерпывающие данные о составе клеточных стенок с помощью различных химических методов, которые позволяют определять восстанавливающие сахара, незамещенные аминогруппы аминокислот и т. д.

17.4.2. Липополисахариды [42]

Реактивы, материалы и оборудование

Физиологический раствор: 0,9%-ный (вес/объем) раствор NaCl в дистиллированной воде.

Раствор фенола: 10 мл дистиллированной воды добавляют к 90 мл подогретого (60 °C) дважды перегнанного фенола. (*Предостережение!* Фенол вызывает сильные ожоги при попадании на кожу и в глаза. При работе с этим реактивом следует надевать защитные перчатки, одежду и очки. Пары фенола также опасны. С горячим фенолом необходимо работать в вытяжном шкафу.)

Центрифуги, роторы и пробирки: центрифуга на 10 000 g и ультрацентрифуга на 100 000 g; центрифужные пробирки и роторы к ним для обеих центрифуг.

Прибор для лиофилизации или вакуумный эксикатор и вакуумный или водоструйный насос.

Методика

Бактериальные клетки примерно из 3 л ростовой среды центрифугируют при 10 000 g в течение 15 мин. Осадок суспендируют в 300 мл холодного физиологического раствора и снова центрифугируют. Повторяют процесс ресуспендирования и вновь центрифугируют с целью удаления компонентов среды. Отмытые бактерии лиофилизируют или хранят в морозильнике до использования.

20 г (сухого веса) бактериальных клеток тщательно суспендируют в 350 мл воды при 65—68 °C. 350 мл раствора фенола нагревают до температуры 65—68 °C и добавляют к клеточной суспензии. Смесь энергично пере-

мешивают, выдерживают 15 мин при 65°C, а затем охлаждают в ледяной бане до 10°C. Эмульсию центрифугируют 30 мин при 10 000 g. При этом образуются три слоя: водный, фенольный и осадок. Иногда в фенольно-водной интерфазе образуется слой денатурированного белка. Верхний водный слой удаляют и хранят отдельно. Удаляют и отбрасывают вещества на границе раздела фаз. К фенольному слою и осадку добавляют еще 350 мл воды и тщательно перемешивают, поддерживая температуру 65—68°C в течение 15 мин. Смесь вновь центрифугируют и верхний водный слой объединяют с водным слоем, полученным при первом центрифугировании. Водную суспензию диализуют 3—4 дня против дистиллированной воды для удаления фенола и низкомолекулярных примесей. Диализованный раствор концентрируют под вакуумом при 37°C до 5 мл. Для этой цели удобно пользоваться роторным испарителем. Концентрированный раствор центрифугируют при 3000 g в течение 10 мин для удаления нерастворимых веществ. Осадок выбрасывают. Половину суспендированного органического вещества в надосадочной фракции составляет липополисахарид. Основной примесью является РНК. Надосадочную фракцию центрифугируют при 100 000 g в течение 1 ч. Осадок тщательно ресуспендируют в физиологическом растворе и снова центрифугируют 1 ч при 100 000 g. Центрифугирование и ресуспендирование осадка повторяют 5 раз для отмывания его от примесей. Наконец, осадок растворяют в дистиллированной воде и лиофилизуют. Если нет возможности лиофилизовать осадок, суспензию можно высушить в вакуумном эксикаторе. Из 20 г (сухого веса) биомассы бактерий сем. Enterobacteriaceae должно получаться 100—500 мг липополисахарида. Этот липополисахарид представляет собой потенциальный эндотоксин [35, 39], содержащий прочно связанный липид А.

17.4.3. Выделение липида А и полисахарида из липополисахаридной фракции

Липид А можно выделить в виде водонерастворимого продукта после слабокислотного гидролиза очищенного липополисахарида. Полисахаридная часть полимера растворяется в воде.

Реактивы, материалы и оборудование

Уксусная кислота: 1%-ный (по объему) раствор готовят добавлением 1 мл уксусной кислоты к 99 мл дистиллированной воды. (*Осторожно!* Нельзя насыщать уксусную кислоту в пипетку ртом. Все операции выполняют в вытяжном шкафу, избегая контакта с жидкостью или парами. При работе с концентрированной уксусной кислотой рекомендуется надевать защитные очки и одежду.)

Ллиофилизированный препарат липополисахарида.

Ампулы для ллиофилизации на 15 мл.

Баллон со сжатым азотом.

Вакуумный эксикатор или прибор для ллиофилизации.

Центрифуга на 5000 g, 15-мл центрифужные пробирки, соответствующий ротор. Температурный контроль не обязателен.

Методика

0,1 г высушенного липополисахарида, полученного по описанной выше методике, суспендируют в 10 мл 1%-ной уксусной кислоты, через которую предварительно продували азот в течение 10 мин. Ампулу с суспензией запаивают и нагревают в паровой бане 4 ч. Затем ампулу охлаждают и открывают, а ее содержимое переносят в пробирку и центрифугируют 10 мин при 5000 g. Надосадочную фракцию, содержащую полисахаридную часть липополисахарида, осторожно отделяют от нерастворимого липида А и сохраняют для дальнейшего анализа.

Осадок ресуспендируют в дистиллированной воде и снова центрифугируют. Ресуспендирование и центрифугирование повторяют 5 раз. Надосадочные фракции выбрасывают. Осадок высушивают в вакуумном эксикаторе или ллиофилизуют.

Полисахарид, оставшийся в растворе после кислотного гидролиза, диализуют против 200 объемов воды и высушивают путем ллиофилизации или в вакуумном эксикаторе. Из 100—500 мг липополисахарида можно получить 40—100 мг безлипидного полисахарида и 30—150 мг липида А.

Количество липополисахарида или безлипидного полисахарида определяют с помощью тестов на 2-кето-3-дезоксиктанат и гептозу (разд. 17.2.9). Для определения количества липида А в очищенных препаратах применяют тест на гексозамины (разд. 17.2.6).

17.5. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Наиболее широко распространенный метод определения и идентификации дезоксирибозы и рибозы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в клеточных экстрактах включает экстракцию и гидролиз горячим раствором ТХУ или хлорной кислоты и последующее проведение специальных колориметрических анализов для определения пентозных компонентов нуклеиновых кислот. Более удобный способ определения количества ДНК и РНК основан на их способности поглощать УФ-свет при 260 нм. Другие методики, меньше отвечающие целям данного руководства, описаны в рекомендуемых изданиях [59, 63].

Для количественного определения нуклеиновых кислот в культурах бактерий по описанным ниже методикам необходимо, чтобы клетки присутствовали в достаточном количестве в среде, не мешающей определению, или чтобы их можно было собрать из ростовой среды, отмыть от компонентов среды, мешающих определению, и ресуспендировать в нужной концентрации в отсутствие лизиса бактерий или гидролиза нуклеиновых кислот нуклеазами. Важным условием для точного определения содержания в них нуклеиновых кислот является полная экстракция нуклеиновых кислот из клеток.

17.5.1. Определение ДНК по реакции с дифениламином

Из всех колориметрических способов определения и идентификации ДНК в сложных смесях чаще всего используют реакцию этого полимера с дифениламином в смеси уксусной и серной кислот. Химизм этой реакции и природа образующегося окрашенного соединения еще не ясны. Преимущество описываемого ниже метода Бёртона [61] заключается в его чувствительности и в том, что точному определению ДНК мешает лишь очень небольшое число веществ. Другой подобный метод описан в разд. 22.4.3.

Реактивы, материалы и оборудование

Хлорная кислота: 0,5, 1,0 и 2,5 н. растворы. (*Предостережение!* В нагретом состоянии (150 °С) при контакте с окисляющимися веществами хлорная кислота может воспламеняться или взрываться. Необходимо избегать попадания хлорной кислоты на кожу, в глаза и на одежду и работать с ней в вытяжном шкафу.)

Дифениламинный реактив: 1,5 г очищенного дифениламина, перекристаллизованного из кипящего гексана (белые кристаллы, $T_{пл} = 52,9^\circ\text{C}$), растворяют в 100 мл перегнанной уксусной кислоты и добавляют 1,5 мл концентрированной серной кислоты (ч. д. а.; reagent grade). В день использования к каждому 20 мл дифениламинового реагента добавляют по 0,1 мл водного раствора ацетальдегида с концентрацией 16 мг/мл (1 мл ацетальдегида в 50 мл воды). (*Предупреждение!* Ацетальдегид очень летуч и токсичен. Необходимо работать с ним в вытяжном шкафу.)

Цитратно-солевой раствор (ЦСР): 0,15 н. NaCl + 0,015 н. раствор цитратной соли лимонной кислоты, pH 7,0.

Стандартные растворы: имеющуюся в продаже кристаллическую ДНК растворяют в $5 \cdot 10^{-3}$ М NaOH до концентрации 0,4 мг/мл. Стандартные растворы готовят каждые две недели. Сначала смешивают объем основного раствора ДНК с равным объемом 1 н. хлорной кислоты и смесь нагревают при 70 °С в течение 15 мин, а затем из этого раствора делают разведения 0,5 н. хлорной кислотой.

Большинство препаратов ДНК содержит по крайней мере 15% воды, поэтому при подготовке стандартных растворов трудно получить или приготовить совершенно безводную ДНК. Следует помнить о возможных неточностях, возникающих из-за использования таких препаратов ДНК в качестве стандарта. Другим способом приготовления стандартов является гидролиз ДНК и определение содержания фосфата в 1 мг ДНК [62]. Результаты выражают в микрограммах (или миллиграммах) фосфора ДНК, а не самой ДНК.

Удобным стандартом является также дезоксирибоза, приготовленная в виде водного раствора (10^{-3} М). Растворы можно хранить 3 мес в холодильнике. Приготовив разведения основного раствора ДНК 0,5 н. хлорной кислотой, можно построить калибровочную кривую для определения ДНК с дифениламинном. При использовании таких стандартов результаты выражают в виде дезоксирибозных эквивалентов ДНК.

Спектрофотометр или колориметр и стеклянные кюветы.

Центрифуга, позволяющая работать при 10 000 g. Центрифуга должна иметь охлаждающее устройство или находиться в холодной комнате.

Центрифужные пробирки на 15 или 30 мл.

Водяная баня с температурой 70 °С и термостат или водяная баня с температурой 30 °С.

Пробирки из пирексового стекла размером 15×125 мм.

Методика

Используют суспензию, приготовленную из 5—10 мг (сухого веса) биомассы бактерий в 1 мл ($\sim 5 \cdot 10^{10}$ — $1 \cdot 10^{11}$ клеток на 1 мл для бактерий, имеющих размер клеток *E. coli*).

Если в культуре концентрация клеток недостаточна или если в среде присутствуют вещества, мешающие определению, то клетки собирают центрифугированием. Комплексные среды содержат компоненты нуклеиновых кислот и сахара, которые удаляются при сборе и отмывании клеток центрифугированием. Для большинства бактерий клетки собирают центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин при 4—5°C. Осажденные клетки суспендируют в ЦСР в объеме, составляющем $1/10$ объема культуры. Клетки центрифугируют 15 мин при 5000 g и температуре 5°C и ресуспендируют в холодном ЦСР. Если клетки растут в солевой среде и концентрация их достаточна, культуру можно использовать для выделения ДНК непосредственно.

Каждую пробу бактериальной культуры или суспензии бактерий в ЦСР подкисляют достаточным количеством 2,5 н. хлорной кислоты до получения конечной концентрации перхлората 0,25 н. Подкисленную пробу охлаждают во льду в течение 30 мин и центрифугируют 10 мин при 10 000 g. Осадок, содержащий нуклеиновые кислоты, суспендируют в 0,5 мл 0,5 н. хлорной кислоты, помешивая стеклянной палочкой. Добавляют еще 3,5 мл 0,5 н. хлорной кислоты и нагревают суспензию 15 мин при 70°C. Во время этой процедуры следует периодически помешивать или встряхивать суспензию. Подогретую суспензию центрифугируют 10 мин при комнатной температуре при 5000 g и осторожно сливают надосадочную фракцию в 10-мл градуированную пробирку. Осадок вновь экстрагируют таким же образом. Объединяют оба экстракта, записывают их объемы и перемешивают.

Для проведения реакции с дифениламином различные аликвоты объединенных экстрактов смешивают с достаточным количеством 0,5 н. хлорной кислоты до получения объема 2 мл. Целесообразно из каждого экстракта готовить 10-кратные разведения (0,2 мл, 1,0 мл и

2,0 мл), для того чтобы быть уверенным в том, что интенсивность окраски будет в пределах стандартной калибровочной кривой. Доводя объемы всех проб до 2,0 мл, добавляют в каждую пробирку по 4,0 мл дифениламинового реактива и тщательно перемешивают. Объем в пробирках с разведениями стандартных проб (от 5 до 100 мкг/мл) также доводят до 2,0 мл с помощью 0,5 н. хлорной кислоты и смешивают их содержимое с 4,0 мл дифениламинового реактива. Контрольную (слепую) пробу для спектрофотометра готовят, смешивая 4 мл дифениламинового реактива и 2,0 мл 0,5 н. хлорной кислоты. Пробирки инкубируют при 30 °C 16—20 ч (или в течение ночи). Если раствор в пробирках мутный, его центрифугируют при 10 000 g 15 мин для удаления негидролизованного белка. Измеряют оптическую плотность надосадочной фракции при 600 нм, используя для сравнения контрольную пробу (разд. 16.1.1). Концентрацию ДНК в каждой пробирке определяют по калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью стандартных растворов ДНК и концентрацией в них ДНК, дезоксирибозы или фосфата.

Тщательный контроль температуры не обязателен. Если все пробирки, в том числе пробирки со стандартными растворами, инкубируют при одинаковой температуре, ее значение не влияет на результаты. Калибровочную кривую получают для каждой серии определений.

17.5.2. Определение РНК по реакции с орцином

Реакция альдопентоз с подкисленным орцином, в результате которой образуется зеленый хромофор, является классической реакцией в химии сахаров. Эта реакция позволяет определять содержание рибозы в РНК. 20% общей окраски дает дезоксирибоза. С помощью этой реакции определяют РНК или рибонуклеотиды в растворе, а также в тканях или клеточных экстрактах [62].

Реактивы и оборудование

Хлорид железа(III): 100 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл концентрированной HCl (ч. д. а., reagent grade). (*Предостережение!* См. разд. 17.3.3.)

Спиртовой раствор орцина: 6,0 г орцина растворяют в 100 мл этанола. Хранят в темной склянке. Имеющийся в продаже орцин обычно кристаллизуют из бензола. Если получают желтые кристаллы, необходима перекристаллизация.

Орциновый реактив: в день использования реактива смешивают равные объемы реактивов хлорида железа(III) и спиртового раствора орцина. Окончательный раствор реактива должен быть ярко-желтого цвета.

Хлорная кислота и соляная кислота: 0,1 н. (*Предостережение!* См. разд. 17.5.1.)

Стандартные растворы для анализа РНК. Раствор, содержащий 200 мкг/мл РНК нагревают с 0,25 н. хлорной кислотой при 70 °С в течение 30 мин. Добавляют равный объем 0,1 н. HCl до конечной концентрации РНК 100 мкг/мл.

Предпочтительным стандартом является аденозин-5'-монофосфат (АМР), поскольку его концентрацию можно точно измерить. Раствор АМР с концентрацией 200 мкг/мл нагревают в 0,25 н. хлорной кислоте и добавляют к нему равный объем 0,1 н. HCl . В результате получают раствор АМР с концентрацией 100 мкг/мл.

Спектрофотометр или колориметр и стеклянные кюветы или пробирки.

Водяная баня с температурой 90 °С.

Пробирки из пирексового стекла размером 18×125 мм.

Стеклянные шарики диаметром около 20 мм.

Методика

Готовят гидролизаты из суспензий бактериальных клеток, обрабатывая их хлорной кислотой, как описано в методике по выделению ДНК (разд. 17.5.1). Гидролизаты клеток разбавляют 0,1 н. HCl так, чтобы они содержали от 10 до 100 мкг РНК в 1 мл. [Гидролизаты клеток из 0,8—1 мг (сухого веса) биомассы содержат около 100 мкг РНК.] Разбавленные гидролизаты и стандарты смешивают с двумя объемами орцинового реактива, закрывают пробирки стеклянными шариками и нагревают 30 мин при 90 °С. Объемы проб зависят от типа спектрофотометра или колориметра. В большинстве случаев 1,0 мл экстрактов или стандартов смешивают с 2 мл орцинового реактива. Пробирки охлаждают в струе водопроводной воды и измеряют оптическую плотность раствора в каждой из них при 665 нм. Концентрацию РНК или нуклеотидов определяют по калибровоч-

ной кривой, полученной для известных количеств АМР или РНК (разд. 16.1.1). Калибровочную кривую следует строить для каждого анализа или серии анализов. С помощью реакции с орцином можно достоверно измерить от 15 до 100 мкг РНК в экстракте бактериальных клеток.

Применяя в качестве стандарта АМР, результаты выражают в виде пуринрибозидных эквивалентов РНК.

17.5.3. Другие методы определения ДНК и РНК

Чистые растворы ДНК или РНК, не содержащие белков и углеводов, можно анализировать методом УФ-спектроскопии (разд. 22.4.1). Раствор, содержащий 1 мг чистой нуклеиновой кислоты в 1 мл, имеет оптическую плотность при 260 нм $\sim 22-23$.

Помимо колориметрического анализа ДНК в клетках и тканях существует еще один быстрый и чувствительный способ, описанный Цаном [63]. Он основан на определении тимина в гидролизатах клеток с помощью газовой хроматографии. Недостаток этого способа в том, что он требует наличия газового хроматографа. Если измерения ДНК проводят ежедневно, то применение газового хроматографа в этом случае оправданно из-за экономии времени.

Применение методики

Описанная выше методика позволяет выделять около 95% нуклеиновых кислот из бактериальных клеток и эндоспор. Если же с ее помощью не удастся полностью экстрагировать нуклеиновые кислоты, о чем можно судить по наличию ДНК в растворимой фракции после третьей экстракции осадка, то в этом случае применяют другой способ экстракции. Он заключается в обработке клеток 5%-ной (вес/объем) ТХУ с нагреванием в течение 15 мин при 90°C. Экстракт разбавляют до требуемого объема 5%-ным трихлорацетатом и анализируют по описанной выше методике.

Если нужно определить концентрацию очищенной ДНК в растворе, пробы обрабатывают один раз 0,5 н. HClO_4 при 70°C в течение 15 мин. Пробы с обрабо-

танной ДНК анализируют по реакции с дифениламином, как описано выше. При низких концентрациях ДНК осаждение нуклеиновой кислоты охлажденной хлорной кислотой приводит к относительно большим потерям. Поэтому в случае чистых растворов ДНК этот этап проводить не следует. При необходимости осаждения ДНК из разбавленных растворов с целью ее отделения от мешающих определению веществ, например нуклеотидов, в каждую пробирку можно добавить 100 мкг бычьего сывороточного альбумина в качестве соосадителя. Этот прием способствует лучшему осаждению ДНК.

Колориметрия и УФ-спектрофотометрия применимы в случае любых РНК. Все РНК имеют одинаковый коэффициент экстинкции при колориметрическом определении. В присутствии белков, полисахаридов и многих других веществ, поглощающих УФ-свет (в том числе фенола, который часто применяется при выделении нуклеиновых кислот), точность УФ-спектрофотометрического анализа снижается. Отклонения от нормального спектра свидетельствуют о загрязнении белком, углеводом или другими соединениями.

При определении РНК с орцином анализу мешают гексозы, дающие коричневую окраску. Поэтому определение количества РНК в сахарозных градиентах или в растворах, содержащих гексозы или их полимеры, лучше всего проводить с помощью УФ-спектрометрии.

Преимуществом УФ-спектрометрии является то, что при ее применении не происходит разрушения вещества, а это существенно при наличии небольших количеств нуклеиновых кислот. Важно также и то, что она проста и удобна на практике.

Если известно количество клеток в единице объема, можно рассчитать количество ДНК на клетку по содержанию ДНК в суспензии и на основе этих данных — размер генома бактерии [59].

17.6. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Выбор наиболее подходящего метода анализа азота в каком-либо соединении зависит от вида анализируемого азота, его концентрации и наличия мешающих оп-

ределению веществ. Наиболее распространенный способ определения нитритного азота включает модификацию диазотирования и связанных с ним реакций. Для определения нитратного, аммонийного, а также органического азота применяют другие методы. В табл. 17.1 сравнивается чувствительность некоторых методов и указаны случаи их применения. Ниже мы опишем наиболее простые и вместе с тем широко применяемые методы анализа азота в различных содержащих его соединениях. Ссылки на литературу, содержащую описание других методов, приведены в табл. 17.1.

Ввиду разнообразия веществ, которые можно проверять на содержание азота (например, молоко, удобрения, почва, материалы растительного и животного происхождения), многие методы, перечисленные в табл. 17.1, приходится модифицировать или же необходимо проводить предварительную обработку пробы, так чтобы ее можно было использовать в условиях анализа. Описано много вариантов методик, приведенных здесь полностью или только перечисленных; поэтому, обратившись к литературе, можно выбрать метод, подходящий для данного образца.

17.6.1. Нитрит (см. также разд. 16.2.2)

Анализ нитритного азота основан на реакции NO_2^- с сульфаниламидом в кислой среде с образованием диазосоединения. Последнее реагирует с N-(1-нафтил)-этилендиамином, образуя краситель, поглощающий свет при 543 нм [73, 80]. Указанные реактивы можно заменить сульфаниловой кислотой и α -нафтиламином, однако последний признан канцерогеном и должен применяться под строгим контролем.

С помощью этой реакции можно определять до 1 мкг/л NO_2^- при толщине кюветы 10 см. Поглощение окрашенного соединения подчиняется закону Ламберта — Бэра (разд. 16.1.1) до концентрации NO_2^- 180 мкг/л [68]. Ионы, вызывающие осаждение NO_2^- и, следовательно, мешающие определению, перечислены в табл. 17.1. В их присутствии необходимо применять другой метод обнаружения NO_2^- , например его восстановление и последующий анализ NH_4^+ . Как и при любом

Таблица 17.1. Сравнение аналитических методов определения азота

Соединение азота	Аналитический метод	Минимальные количества азота	Вещества, мешающие определению	Основные достоинства	Основные недостатки	Источники данных
NO ₂ ⁻	Диазотирование	1 мкг/л	Cl ⁻ , окрашенные вещества, взвешенные частицы, ионы Sb, Bi, Fe(III), Pb, Hg, Ag, соли Cu (III), Au, хлорплатинат, метаванадат	Простота	Мешает присутствие Cl ⁻ и Fe ³⁺	[64, 68, 73, 80, 92]
	Восстановление до NH ₄ ⁺ горячей щелочью или салициловой кислотой с последующим анализом NH ₃ ^a Другие методы ^b	>2 мг/л	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	Удобно при [NO ₂] ⁻ > 2000 мкг/л	Применение горячей щелочи, необходимость перегонки, образование NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	[61, 62, 68, 70]
NO ₃ ⁻	Восстановление до NO ₂ ⁻ с последующим анализом на NO ₂ ^{-a}					[97, 104]

Восстановление Cd—Cu	Восстановление до 95%	$[S^{2-}] > 2$ мг/л может активировать колонки	Быстрое восстановление при наличии приготовленной колонки	Приготовление колонки	[73]
Восстановление Cd—Hg	То же	То же	То же	Приготовление колонки, использование Hg	[68]
Восстановление Zn	Восстановление $\geq 95\%$ ^a		Не требуется приготовления колонки	Большее время восстановления	[81, 92]
Измерение оптической плотности при 220 нм	40 мкг/л	Многие органические соединения, NO_2^- , ПАВ, хромат ⁶⁻ , окрашенные вещества	Простота	Необходимость УФ-спектрофотометра, помехи за счет многих органических соединений	[68]
Метод с использованием бруцина	100 мкг/л	Окрашенные вещества, взвешенные частицы, сильные окислители, сильные восстановители, NO_2^- , органические вещества в высокой концентрации, Cl^- , ионы Fe, Mn^{4+}		Бруцин — высокотоксичный алкалоид (его необходимо взвешивать в вытяжном шкафу); низкая чувствительность; помехи за счет окислителей и восстановителей	[68]

Соединение азота	Аналитический метод	Минимальные количества азота	Вещества, мешающие определению	Основные достоинства	Основные недостатки	Источник данных
	Метод с использованием хромотроповой кислоты	100 мкг/л	Окрашенные вещества, взвешенные частицы, Ba, Pb, Sr, иодид, нодат, селенит, селенат, хромат	Окраска устойчива в течение 24 ч	Низкая чувствительность	[68]
	Нитрофенолдисульфоновый метод	20 мкг/л	Органические вещества, Cl ⁻ NO ₂ ⁻	Простой и прямой метод	Необходимость сушки, помехи за счет органических соединений Для приготовления реагентов необходимо кипячение H ₂ SO ₄	[64, 65, 93, 100]
	Восстановление до NH ₄ ⁺ горячей щелочью или салициловой кислотой с последующим анализом NH ₄ ⁺	>2 мг/л	NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺	Удобно, когда азота в NO ₃ ⁻ >2 мг/л	Использование горячей щелочи, необходимость перегонки, образование NO ₃ ⁻ + NO ₂ + NH ₄ ⁺	[64, 65, 68, 84]

NH_4^+ Другие методы^бОкисление^а до NO_2^- с последующим анализом NO_2^-

Использование индофенолового синего (известного также как феиат)

Применение раствора Несслера

10 мкг/л

20 мкг/л

Аминокислоты, атмосферный NH_3

Взвешенные частицы, окрашенные вещества, избыток кислоты или щелочи, соединения азота с низкой молекулярной массой

Взвешенные частицы, окрашенные вещества, ионы Mg, Fe, Ca, S, Мп, Cl, низкомолекулярные органические соединения

Не требуется перегонки

Простота; инаиболее предпочтительный колориметрический метод после метода Кьельдаля

Удобно для растворов образцов в чистой воде

Выделение NO_2^- из некоторых аминокислот

Может потребоваться предварительная перегонка; применение фенола; неустойчивость реактивов

Может потребоваться предварительная перегонка; применение Hg

[70, 75, 76, 84, 103, 104]
[73]

[64, 68, 99]

[64, 68]

Соединение азота	Аналитический метод	Минимальные количества азота	Вещества, мешающие определению	Основные достоинства	Основные недостатки	Источники данных
Суммарный органический азот	Ацидиметрический метод	2 мкг/л	Cl ⁻	После этапа перегонки методика проста; удобна при высоком содержании NH ₄ ; наиболее предпочтительный метод после метода Кьельдаля	Необходимость перегонки	[64, 68, 70]
	Пиридин-пиразоловый способ	50 мкг/л	Ионы Fe, Zn, Ag, Cu, цианат	Специфичен для NH ₄ ⁺	Использование пиридина	[73, 88]
	Метод Кьельдаля с последующим анализом на NH ₄ ⁺ или окисление до NO ₂ ⁻ и анализ на NO ₂ ^{-a}		NH ₄ ⁺ (определяют отдельно и вычитают или отгоняют)	Количественное определение	Использование Hg (см. работы, указанные в ссылках), необходимость перегонки, образование паров H ₂ SO ₄	[64, 65, 66, 68, 70, 71, 73, 79, 98]

Азот белка	Метод Лоури	30 мг/л	Аминокислотный или пептидный буфер, меркаптаны, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Высокая чувствительность	Результаты варьируют в зависимости от аминокислотного состава; не подчиняется закону Ламберта — Бэра	[67, 82, 91]
	Биуретовый метод	1 г/л	Аминокислотный или пептидный буфер	Быстрота	Низкая точность или чувствительность; результаты варьируют в зависимости от аминокислотного состава	[67, 70, 89]
	УФ-Спектрофотометрия	10 мг/л	Нуклеиновые кислоты, фенольные соединения	Простота	Необходимость УФ-спектрофотометра; помехи за счет нуклеиновых кислот	[86, 87, 89, 105]
	Связывание с красителем	30 мг/л	Детергенты	Реакция не так сильно зависит от состава белка, как в методе Лоури; быстрота	Использование фосфорной кислоты	[78, 95, 101]
	Флуориметрический анализ	5 мкг/л	Аминокислотный или пептидный буфер	Быстрота, высокая чувствительность, небольшой объем пробы, удобен для очищенных белков	Результаты варьируют в зависимости от аминокислотного состава; использование диоксана	[77, 94]

Соединение азота	Аналитический метод	Минимальные количества азота	Вещества, мешающие определению	Основные достоинства	Основные недостатки	Источник данных
Суммарный азот	Расщепление по Кьельдалю, восстановление NO_3^- и NO_2^- до NH_4^+ и анализ на NH_4^+ ; отдельное определение азотсодержащих соединений и суммирование результатов ^а			Определение суммарного азота; можно использовать реактивы, приготовленные для других определений	Длительность анализа	[64, 73, 79, 98]

^а См. сведения об анализе этого типа соединений азота.

^б Сюда включены новые методы и (или) некоторые из методов, не применимые к большинству проб без модификаций.

колориметрическом анализе, присутствие в образце окрашенного соединения или вещества в виде частиц может мешать определению, особенно при использовании кювет толщиной 10 см. Ошибку за счет присутствия окрашенных веществ можно уменьшить путем предварительного разбавления раствора, если концентрация NO_2^- достаточно высока. Другим выходом является обработка раствора активированным углем, с помощью которой часто удается удалить мешающие определению соединения. Частицы (например, бактериальные клетки) можно удалить центрифугированием или фильтрованием через мелкопористый 0,45-мкм фильтр.

Обработка проб

Пробы следует анализировать немедленно или хранить замороженными при -20°C до проведения анализа. Пробы для теста на NO_2^- нельзя хранить вместе с кислотой. Перед анализом рекомендуется нейтрализовать все пробы до pH 7,0.

Реактивы

Вода, не содержащая NO_2^- . В большинстве случаев дистиллированная вода не содержит NO_2^- . При отсутствии источника такой воды ее можно приготовить самим: на 1 л воды добавляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 (*осторожно!* H_2SO_4 — едкое соединение; нельзя допускать ее расплескивания, нельзя насасывать ее в пипетку ртом) и 0,2 мл MnSO_4 (36,4 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на 100 мл дистиллированной воды). Раствор окрашивают в розовый цвет, добавляя 1—3 мл KMnO_4 (400 мг KMnO_4) на 1 л.

Сульфаниламидный реактив: 5 г сульфаниламида добавляют к 300 мл дистиллированной воды, содержащей 50 мл концентрированной HCl . (*Осторожно!* Концентрированная HCl — едкое вещество. Ее необходимо добавлять в воду медленно. Следует избегать вдыхания ее паров.) Объем доводят до 500 мл дистиллированной водой. Раствор хранят при комнатной температуре несколько месяцев.

Раствор N-(1-нафтил)-этилендиаминадигидрохлорида: 500 мг N-(1-нафтил)-этилендиаминадигидрохлорида растворяют в 500 мл воды. Раствор хранят в темном месте. Примерно через месяц появляется коричневая окраска, свидетельствующая о том, что реактив испорчен.

Стандартные растворы NO_2^- [68]. Готовят основной раствор NO_2^- , растворяя 0,1411 г NaNO_2 в 500 мл дистиллированной воды. Используют свежеприготовленный раствор, так как NO_2^- легко окисляется в присутствии воды. Бутыль с основным раствором хранят закупоренной. В 1 мл раствора содержится 50 мкг азота в форме NO_2^- . Разбавляя основной раствор, готовят стандарты для получения калибровочной кривой.

Методика

1 мл раствора сульфаниламида добавляют к 50 мл пробы и оставляют не менее чем на 2 мин, но не более чем на 8 мин. Нежелательные побочные реакции и распад веществ начинаются после 10 мин [73]. Добавляют 1 мл N-(1-нафтил)-этилендиамина и немедленно перемешивают. Ждут развития окраски по меньшей мере в течение 10 мин и затем определяют оптическую плотность при 543 нм (разд. 16.1.1).

Из основного раствора NO_2^- с концентрацией 50 мкг/л готовят серию стандартных растворов с концентрациями от 0 до 25 мкг/л нитритного азота. Строят график зависимости между концентрацией $[\text{NO}_2^-]$ и оптической плотностью при 543 нм (разд. 16.1.1). Концентрацию нитритного азота в образце определяют по калибровочной кривой или по коэффициенту экстинкции (ϵ) (наклон кривой) с помощью линейной регрессии. Этот коэффициент экстинкции применяют в последующих определениях с теми же реактивами. При использовании новых реактивов получают новую калибровочную кривую.

17.6.2. Нитрат (см. также разд. 16.2.2)

Выбор описываемой здесь методики определения NO_3^- обусловлен ее относительной простотой, а также тем, что в ней используются реактивы, приготовленные для определения NO_2^- . Этот метод основан на восстановлении NO_3^- в NO_2^- и последующем анализе NO_2^- . Обычно используют один из двух способов восстановления NO_3^- в NO_2^- , которые описаны здесь: цинком [81, 92] или кадмием [68, 86].

Восстановление NO_3^- в NO_2^- с помощью Zn — это несложная процедура, включающая реакцию пробы с цинковой пылью в течение 30 мин и фильтрование. Недостаток данной методики — длительность анализа каждой пробы.

Восстановление NO_3^- с помощью Cd, амальгамированного Cu, осуществляют, пропуская пробу, обработанную NH_4Cl (для предотвращения инактивации колонки), через заранее приготовленную колонку с Cd и Cu^{2+} .

Проведение самого анализа отличается простотой, однако необходима предварительная подготовка колонки с восстановлением.

После восстановления NO_3^- в NO_2^- по любой из приведенных методик последний анализируют описанным выше методом. Поскольку этот метод предназначен для определения суммарного количества NO_2^- , часть пробы следует анализировать на NO_2^- до восстановления. Содержание NO_3^- определяют, вычитая полученный результат из суммарного количества NO_2^- .

Обработка проб

Пробы обрабатывают, как описано выше в методике определения нитрита.

Восстановление цинком

Реактивы. Все реактивы рекомендуется готовить на дистиллированной воде, не содержащей NO_2^- (разд. 17.6.1).

Буферный раствор: 50 мл 0,2 М KCl смешивают с 34 мл 0,2 н. HCl и объем доводят водой до 400 мл. pH доводят до 1,5 с помощью HCl .

NH_4Cl : 2%-ный раствор (вес/объем).

Порошок цинка.

Методика. Пробы по 25 мл вносят в 50-мл колбы, закрывающиеся пробками, добавляют к ним 1,0 мл 2%-ного NH_4Cl и 2 мл буфера и нагревают до 20—25 °С. Добавляют по 0,2 г цинкового порошка и оставляют на 30 мин, изредка помешивая. Частицы цинка удаляют фильтрованием через крупнопористую фильтровальную бумагу.

Восстановление кадмием

Реагенты. Раствор сульфата меди: 2%-ный (вес/объем) раствор.

Концентрированный раствор NH_4Cl : 175 г NH_4Cl растворяют в 500 мл дистиллированной воды.

Разбавленный раствор NH_4Cl : 1 часть концентрированного раствора NH_4Cl разбавляют 40 частями воды, не содержащей NO_2^- , для получения концентрации 4,38 г в 500 мл воды.

Приготовление колонки. Верхняя часть колонки размером 1×30 см специально приспособлена для одновременного внесения всей пробы. Нижняя часть колонки должна быть снабжена краном типа бюреточного или же соединена с помощью резиновой трубки с пружинным зажимом, позволяющим останавливать поток, что необходимо для предотвращения высыхания сорбента в колонке. На дне колонки должна быть стекловата или тампон из тонкой медной проволоки. Небольшое количество стекловаты или медных опилок часто помещают в верхнюю часть колонки для предотвращения нарушения слоя кадмиево-медных амальгамированных опилок при внесении пробы.

Кадмиевые опилки получают, обрабатывая бруски чистого кадмия (ч. д. а.; reagent grade) грубым ручным металлическим напильником. Отбирают фракцию, проходящую через 2-мм сито, но задерживающуюся на 0,5-мм сите. Приблизительно 50 г опилок перемешивают с 250 мл 2%-ного $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ до тех пор, пока не исчезнет голубая окраска раствора и над осадком не начнут появляться полукolloидные частицы меди. Суспензии дают отстояться в течение 10 мин. Колонку заполняют разбавленным раствором NH_4Cl или надосадочной фракцией, полученной в результате амальгамирования $\text{Cd} - \text{Cu}$; затем медленно вливают в нее суспензию опилок $\text{Cd} - \text{Cu}$ до образования столбика высотой около 30 см. Колонку трижды промывают 100 мл разбавленного раствора NH_4Cl . Скорость потока устанавливают около 10 мл/мин.

Методика. К 100 мл пробы добавляют 2 мл концентрированного раствора NH_4Cl . 5 мл этого раствора наносят на колонку и позволяют жидкости подняться до верхней части колонки. Это делается для того, чтобы при введении в колонку оставшейся части пробы не возникало ошибок за счет остатков предыдущей.

Вводят оставшуюся часть пробы в колонку. Первые 25—30 мл элюата отбрасывают, а последующие 50 мл собирают для анализа. Остальную часть элюата отбрасывают. Колонку можно использовать повторно до 100 раз; при этом промывания ее между анализами обычно не требуется. Однако, если колонку не исполь-

зуют в течение нескольких часов, ее следует промыть разбавленным раствором хлорида аммония.

50 мл отобранного для анализа элюата тестируют на NO_2^- (разд. 17.6.1) как можно быстрее после восстановления.

17.6.3. Определение аммония в реакции с образованием индофенолового синего [100]

Для определения концентрации NH_4^+ разработано много методов (табл. 17.1). Один из наиболее простых методов основан на реакции аммиака, гипохлорита и фенола с образованием индофенолового синего. Реакцию катализируют ионы Mn^{2+} . Окраску измеряют с помощью колориметра или спектрофотометра при 630 нм [64, 68, 99]. Неудобство этого способа заключается в необходимости применения фенола и неустойчивости реактивов.

Другим простым способом (по методу Несслера) NH_4^+ определяют в реакции со ртутью и иодидом калия в щелочном растворе, где он образует окрашенное соединение, которое анализируют с помощью спектрофотометра или колориметра [64, 68]. Основной недостаток этого способа — необходимость применения ртутных соединений. Оба метода описаны ниже.

Еще одна почти столь же простая методика позволяет использовать реактивы, приготовленные для определения NO_2^- ; она заключается в окислении NH_4^+ до NO_2^- [73] и последующем определении NO_2 . Однако для окисления NH_4 , которое занимает 3,5 ч, необходимы дополнительные реактивы, поэтому мы рекомендуем применять индофеноловый метод или метод Несслера.

При необходимости очень специфического способа определения NH_4^+ наиболее удобным может быть пиридин-пиразоловый метод [73, 88]. См. также разд. 16.2.2.

Обработка проб

Пробы обрабатывают, как описано в разд. 17.6.1. При большом содержании мешающих определению веществ (табл. 17.1) иногда некоторые реактивы приходится перед проведением анализа перегонять [68].

Реактивы

Вода, не содержащая аммония. На каждый 1 л дистиллированной воды добавляют по 0,1 мл концентрированной H_2SO_4 (*осторожно*: H_2SO_4 — едкое соединение; нельзя насасывать ее в пипетку ртом и допускать ее разбрызгивания) и проводят перегонку. Для каждой серии проб готовят свежую воду, так как она быстро загрязняется парами NH_4^+ из окружающего воздуха. Можно также использовать ионообменную колонку. Выбирают ионообменную смолу, максимально связывающую NH_4^+ и другие мешающие определению органические вещества.

0,003 М MnSO_4 : 50 мг $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды, очищенной от NH_4^+ .

Гипохлоритный реактив: смешивают 10 мл имеющейся в продаже хлорной извести (5%-ный раствор гипохлорита) и 40 мл дистиллированной воды, очищенной от ионов NH_4^+ . pH доводят до 6,5—7. Каждую неделю готовят свежий раствор.

Фенолятный реактив: 2,5 г NaOH и 10 г фенола растворяют в 100 мл дистиллированной воды, очищенной от NH_4^+ . Ежедневно готовят свежий раствор. (*Осторожно!* Фенол быстро проникает через кожу и вызывает сильные ожоги. Твердый фенол взвешивают в перчатках, фартуке и защитных очках. Работают в вытяжном шкафу, избегая вдыхания паров. Нельзя насасывать фенол в пипетку ртом.)

Стандартные растворы NH_4^+ . Готовят основной раствор NH_4^+ , растворяя 381,9 мг безводного NH_4Cl (высушенного при 100°C) в воде, не содержащей NH_4^+ , и доводят объем до 1 л. 1 мл такого раствора содержит 100 мкг азота и 122 мкг NH_3 . Стандарты получают разбавлением основного раствора до концентраций от 0,1 до 5 мкг аммонийного азота на 10 мл.

Методика

В небольшой химический стакан или колбу помещают 10 мл пробы и 0,05 мл (1 каплю) раствора MnSO_4 . При постоянном перемешивании (для этого лучше всего пользоваться магнитной мешалкой) добавляют 0,5 мл гипохлоритного реактива. Затем сразу же добавляют по каплям 0,6 мл фенолятного реактива.

Реакция протекает 10 мин с образованием устойчивой в течение 24 ч окраски. Интенсивность окраски измеряют с помощью колориметра или спектрофотометра при 630 нм. Контрольную пробу и калибровочную кривую готовят ежедневно, так как при хранении реактивов интенсивность окраски может меняться.

17.6.4. Определение аммония методом Несслера

Пробы

Пробы обрабатывают, как описано в разд. 17.6.1. При большом содержании мешающих определению веществ (табл. 17.1) может потребоваться предварительная перегонка реактивов [68].

Реактивы

Вода, не содержащая аммония. Готовят, как описано в разд. 17.6.3.

Реактивы для удаления больших количеств мешающих определению катионов: 100 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в воде, не содержащей аммония, и доводят объем до 1 л. 6 н. NaOH готовят растворением 240 г NaOH в воде, не содержащей аммония и доводят объем до 1 л.

Реактив для удаления следовых количеств мешающих определению катионов. 50 г $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ растворяют в 60 мл воды, очищенной от аммония, но содержащей 10 г NaOH. (Для растворения реактивов может потребоваться нагревание.) Охлажденный раствор разбавляют до 100 мл водой, не содержащей аммония.

Реактив Несслера. 100 г HgI_2 и 70 г KI смешивают в минимальном количестве воды (100—200 мл). Эту смесь медленно с перемешиванием добавляют к 500 мл 8 н. NaOH (20—25 °C). Доводят объем до 1 л и хранят в стеклянной посуде с резиновой пробкой в темном месте. Реактив устойчив в течение года. (*Осторожно!* Реактив Несслера токсичен. Нельзя насыщать его в пипетку ртом или допускать его разбрызгивание. Остатки необходимо ликвидировать с соблюдением соответствующих для ртутных препаратов предосторожностей.) Реактив проверяют ежемесячно, сравнивая стандартную кривую для аммонийного азота со стандартной кривой, полученной со свежим реактивом. При появлении значительных отклонений в калибровочной кривой старый реактив ликвидируют.

Стандартные растворы NH_4^+ . Готовят основной раствор NH_4^+ , как описано в разд. 17.6.3, и разбавляют его для получения растворов с концентрациями от 20 до 500 мкг/50 мл.

Методика

Мешающие определению NH_4^+ ионы Ca, Mg, S и Fe удаляют двумя способами. При высоком содержании этих ионов к 100 мл пробы добавляют 1 мл раствора ZnSO_4 . Измеряют на pH-метре pH и доводят его до 10,5, добавляя 0,4—0,5 мл 6 н. NaOH. Мешающие определению ионы осаждаются в течение 15 мин. Осадок обычно содержит и другие суспендированные вещества. Его

удаляют фильтрованием через бумагу, не содержащую NH_4^+ , или центрифугированием. Если показано, что в пробе содержатся лишь следовые количества мешающих определению NH_4^+ ионов, к 50 мл пробы добавляют 0,05 мл (1 каплю) раствора ЭДТА, тщательно перемешивая. Пробы, предварительно обработанные ZnSO_4 и щелочью, часто обрабатывают также ЭДТА. Образцы, не содержащие мешающих определению NH_4^+ катионов, можно анализировать с помощью реактива Несслера без предварительной обработки.

Для осуществления реакции к 50 мл пробы добавляют 1 мл реактива Несслера. Для пробы, обработанной ЭДТА, берут 2 мл реактива Несслера. Смесь хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре, по крайней мере на 10 мин. (При низком содержании NH_4^+ лучше оставить на 30 мин.) Все пробы обрабатывают в строго одинаковых условиях, в том числе стандартные и контрольные. Оптическую плотность образовавшегося окрашенного соединения измеряют при длине волны между 400 и 425 нм для проб и стандартов с низким содержанием NH_4^+ (20—250 мкг/50 мл) и между 450 и 500 нм при высокой концентрации NH_4^+ (250—500 мкг/50 мл). При необходимости реакцию можно проводить с пропорционально меньшими количествами пробы, стандартных растворов и реактивов. Чувствительность определения NH_4^+ можно повысить до 5 мкг/50 мл, если использовать кювету толщиной 5 см. Количество аммиака в каждой пробе определяют по калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью каждого стандарта и концентрацией аммиака в стандартном растворе (разд. 16.1.1).

17.6.5. Определение белка с помощью реактива Фолина

Наиболее распространенным колориметрическим способом определения белков является метод Лоури и др. [90] с использованием реактива Фолина. В реакции с этим реактивом получают синее окрашивание в результате взаимодействия белка с ионом меди в щелочном растворе (биуретовая реакция) и восстановления фос-

фомолибдат-фосфовольфрамовой кислоты в составе реактива Фолина ароматическими аминокислотами анализируемого белка.

Описываемая ниже методика применима как к белкам, уже находящимся в растворе, так и к белкам, растворимым в разбавленных щелочах.

Реактивы

Реактив А: 20 г Na_2CO_3 растворяют в 1 л 0,1 н. NaOH .

Реактив Б: 0,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл 1%-ного (вес/объем) водного раствора тартрата натрия.

Реактив В: непосредственно перед использованием смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива Б, раствор хранят не более одного дня, затем готовят новый.

Реактив Г: разбавленный реактив Фолина. Концентрированный реактив Фолина — Чиокальто, поставляемый несколькими фирмами (например, Fisher Scientific Co., Pittsburg, Pa.), разбавляют согласно приложенной инструкции. (*Предостережение!* Этот реактив содержит сильную летучую кислоту, его нельзя насасывать в пипетку ртом. При работе необходимо надевать защитные перчатки, одежду и очки, особенно при использовании встряхивателя Vortex.)

Стандартный раствор белка. Пригодны любые имеющиеся в продаже препараты белков или стандартные растворы. Кристаллический бычий сывороточный альбумин или растворы бычьего сывороточного альбумина, приобретенные у фирм, дают вполне приемлемые калибровочные кривые. Основной стандартный раствор должен содержать 0,5 мг белка на 1 мл дистиллированной воды. С различными белками получают различные калибровочные кривые. При опубликовании результатов следует указывать, какой стандарт белка использовался в работе.

Методика

Пробы, содержащие 50—250 мкг белка (в объеме до 1 мл) вносят в пробирки. Объем каждой пробы доводят до 1,0 мл дистиллированной водой. Добавляют по 5,0 мл реактива В и хорошо перемешивают. Смесь оставляют, по крайней мере, на 10 мин, при комнатной температуре. Добавляют 0,5 мл реактива Г и сразу же перемешивают. Реактивность этого реагента к добавленному белку сохраняется всего несколько секунд после разбавления. Пробы оставляют при комнатной температуре в течение 30 мин или более и измеряют оптическую плотность при 500 нм с помощью спектрофотометра или колориметра. Метод обладает большей чувст-

вительностью, если измерять оптическую плотность при 750 нм в соответствующем спектрофотометре.

Если есть кювета на 1 мл и соответствующий прибор, все объемы можно уменьшить в 5 раз, сохранив тем самым часть реактивов и пробы. Объем проб и стандартных растворов может быть 0,2 мл, а реактивов В и Г, добавляемых через указанные промежутки времени, — 1,0 и 0,1 мл соответственно.

Когда определяют белок в клетках бактерий или анализируют белки, не растворимые в разбавленной щелочи, необходимо нагревать суспензию при 90°C в 1 н. NaOH в течение 10 мин для полной солиubilизации. Стандартный раствор обрабатывают подобным образом, так как в результате такой обработки снижается интенсивность окраски. В случае применения этой процедуры для растворения или экстракции белков реактив А заменяют реактивом, содержащим 20 г NaCO₃ в 1 л воды. В остальном методика остается той же.

Сульфат аммония в концентрации свыше 0,15% мешает развитию окраски. Об этом следует помнить, применяя эту методику к белкам, очищенным путем фракционирования, основанного на их различной растворимости в растворах сульфата аммония. Определению могут мешать и многие другие соли, некоторые сахара, глицин, трис-буфер, некоторые хелатирующие агенты и соединения с сульфгидрильными группами, если они присутствуют в больших концентрациях (1—5 М).

Развитию окраски мешают также ароматические аминокислоты, дающие окрашенный продукт в реакции с фенольным реактивом, и глицин.

Модификация метода Лоури, делающая его пригодным для измерения белка в пробах, содержащих сахарозу или ЭДТА, а также в препаратах мембран и липопротеинов, описана Марквеллом и др. [91]. Эта методика основана на применении детергента (додецилсульфата натрия, ДСН) в составе щелочного карбонатного реактива для увеличения солиubilизации липоидных веществ и на использовании повышенного количества тартрата меди для предотвращения помех за счет сахарозы и ЭДТА. Методика применима в нескольких случаях, в том числе при определении белков во фракциях из сахарозных градиентов.

17.6.6. Определение белка с помощью биуретовой реакции [68, 82]

Благодаря присутствию пептидных связей в щелочных растворах белка образуются окрашенные в синий цвет хелаты с ионами меди. Эта реакция гораздо менее чувствительна, чем метод Лоури, однако она занимает меньше времени и может протекать в присутствии солей аммония и других веществ, мешающих определению белка по методике Лоури. Кроме того, при таком анализе интенсивность окраски на единицу веса белка у различных белков варьирует меньше.

В описываемой ниже модификации биуретовой реакции [83] используется тартрат, образующий с медью комплексы, которые растворимы в NaOH. Белок вытесняет ион меди из комплекса, в результате чего изменяются цвет и интенсивность поглощения.

Реактивы

1,5 г сульфата двухвалентной меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и 6 г калий-натрийтартрата $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 500 мл воды. Добавляют с перемешиванием 300 мл 10%-ного (вес/объем) NaOH. Объем смеси доводят до 1 л дистиллированной водой. При появлении в реактиве осадка красноватого или черного цвета его выбрасывают.

Методика

4 мл биуретового реактива, приготовленного, как описано выше, добавляют к нейтрализованной пробе (1 мл), содержащей 1—10 мг белка. Тщательно перемешивают и инкубируют при комнатной температуре 30 мин. Время и температура должны быть строго одинаковыми для всех проб, в том числе для стандартных и контрольных. Оптическую плотность измеряют при 500 нм. Контрольную пробу готовят, смешивая 1,0 мл воды или водного раствора, применявшегося для растворения белков, и 4,0 мл биуретового реактива. Стандартную кривую строят, используя любой хорошо растворимый белок, например кристаллический бычий сыворо-

точный альбумин. Кривая имеет нелинейный характер из-за конкуренции между тартратом и белком за ионы меди.

Применение методики

Описанный Стикландом [102] модифицированный вариант этой методики применим для определения суммарного белка в бактериальных клетках. В этом случае в 1,0 н. NaOH растворяют клеточный белок, а затем CuSO_4 , не добавляя тартрата. Нерастворимый клеточный материал и $\text{Cu}(\text{OH})_2$ удаляют центрифугированием, при этом окрашенный комплекс Cu — белок остается в растворе.

17.6.7. Определение белка по реакции с кумаси синим

Белки могут связываться с некоторыми красителями, в результате чего происходит сдвиг полос поглощения последних. В описываемой ниже методике в качестве красителя используют кумаси яркий синий. Этот краситель существует в двух видах: его красная анионная форма переходит в синюю, когда краситель присоединяется к аминок группам белков. Протекающие при этом реакции в большинстве случаев более чувствительны и менее подвержены вредному воздействию многих соединений, ограничивающих применение других способов определения белка [78]. Эксперимент с применением красителя занимает гораздо меньше времени, чем процедуры в описанных выше методиках. Чувствительность реакции с красителем сравнима с чувствительностью метода Лоури. Она меньше зависит от вида белка по сравнению с цветными реакциями в описанных выше методиках.

Реактив

100 мг кумаси яркого синего G250 растворяют в 50 мл 95%-ного этанола. Добавляют 100 мл 85%-ной (вес/объем) фосфорной кислоты. (*Предостережение!* Сильная кислота! Ее нельзя насыщать в пипетку ртом. Необходи-

димо работать в защитных перчатках, очках и лабораторной одежде.) Объем доводят до 1 л дистиллированной водой.

Методика

К раствору, содержащему от 10 до 100 мкг белка в 0,1 мл, добавляют 5 мл красителя и тщательно перемешивают. Оптическую плотность при 595 нм измеряют не раньше чем через 2 мин и не позже чем через 1 ч. Для сравнения используют контрольную пробу, содержащую 0,1 мл буферного раствора и 5 мл красителя.

Содержание белка в пробе определяют по калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью стандартных растворов (содержащих от 5 до 100 мкг белка в 1 мл того же буфера, который использовался для растворения опытных проб) и концентрацией белка в каждом стандартном растворе (разд. 16.1.1).

Применение методики

Методика пригодна для определения многих растворимых белков. Детергенты мешают проявлению окраски, поэтому стеклянную посуду необходимо хорошо споласкивать водой. Линейность сохраняется лишь в интервале от 25 до 75 мкг белка в пробе. Другие недостатки этого метода описаны Пирсом и Султером [95].

Имеются описания микро- и других вариантов этой методики, отличающихся высокой воспроизводимостью и позволяющих обнаруживать 1,0 мкг белка [101].

17.6.8. Определение белка спектрофотометрическим методом

Максимум поглощения белков наблюдается при 280 нм; он обусловлен присутствием в белках ароматических аминокислот — тирозина и триптофана. Эти две аминокислоты входят в состав почти всех белков, и диапазон колебаний отношения их содержания к содержанию других аминокислот довольно узок. Определение белков в растворе по оптической плотности раствора в

УФ-области целесообразно, если раствор белка содержит не более 20% (по весу) других соединений, поглощающих УФ-свет, таких, как нуклеиновые кислоты или фенолы, и если он не мутный.

Поправку на поглощение нуклеиновых кислот в растворе, содержащем белок, можно сделать по методу Варбурга и Кристиана [105] или методу Калкара [87].

Оборудование

Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения в УФ-области (разд. 16.1.1).

Кварцевые кюветы, пропускающие УФ-свет.

Методика

Оптическую плотность белков, растворенных в соответствующем буфере, измеряют при 280 и 260 нм. При каждой длине волны измерения проводят относительно контрольной пробы, содержащей буфер. Если отношение оптической плотности при 280 нм к оптической плотности при 260 нм не превышает 1,70, за исключением растворов, о которых известно, что они содержат чистый белок, то концентрацию белка определяют по приведенному ниже уравнению [87] или с помощью соответствующей таблицы [89]. Уравнение используется для того, чтобы учесть вклад, который вносит оптическая плотность нуклеиновых кислот в оптическую плотность раствора:

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260}.$$

Применение методики

Если важно сохранить пробу малодоступного белка, эта методика незаменима. После измерения оптической плотности белок можно использовать в дальнейших исследованиях. Различные белки могут иметь разные коэффициенты экстинкции, поэтому если важна точность измерений, то стандартные растворы следует готовить из одного и того же белка.

17.6.9. Суммарный азот

Общее содержание азота в пробе определяют, суммируя результаты анализов для отдельных азотсодержащих компонентов (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ и органических соединений). Однако если исследователя интересует только суммарный азот, то проведение всех этих анализов, занимающее много времени, излишне. Чаще всего для определения суммарного азота применяют метод Кьельдаля, заключающийся в разложении органических азотсодержащих соединений с образованием NH_4^+ и последующем анализе этого иона по одной из известных методик. Этот анализ включает определение NO_3^- и NO_2^- , восстановленных до NH_4^+ подогретой щелочью [68] или салициловой кислотой и цинком [65]. Другой способ, позволяющий использовать реактивы, приготовленные для анализа NO_2^- , заключается в окислении NH_4^+ до нитрита и последующем анализе нитрита.

Способ расщепления органического вещества зависит от состояния пробы (твердого или жидкого). Поскольку методики расщепления по Кьельдалю разнообразны и сложны, а описания их приводятся в различных статьях, мы рекомендуем читателю обращаться к указанным ниже литературным источникам. Методы расщепления по Кьельдалю, разработанные для жидких проб, включают анализ морской [73] и озерной [64, 68] воды, а также сточных вод [64, 68]. Среди твердых проб могут быть образцы почвы [64—66, 71], осадочных пород [68], удобрений [70], веществ растительного [64, 70] и животного происхождения [70], а также микроорганизмов [68].

17.6.10. Молекулярный азот

Необходимость обнаружения молекулярного азота в биологической системе обычно ограничивается работами по азотфиксации, в которых азот (двухатомный азот) восстанавливается с помощью ферментной системы (называемой нитрогеназой) до аммиака, ассимилируемого клетками. Количественный анализ этой реакции основан на исчезновении азота, который раньше определяли с помощью атомной абсорбции, или на появ-

лении аммония и его измерении по описанному выше методу (разд. 17.6.3). Однако азотфиксацию легче измерять по способности нитрогеназы восстанавливать ацетилен (C_2H_2) до этилена (C_2H_4). Ацетилен и этилен определяют с помощью газовой хроматографии. Восстановление ацетилена обычно определяют в системах, обладающих достаточно высокой нитрогеназной активностью. Это позволяет осуществлять кратковременное воздействие на ацетилен, что сводит к минимуму помехи, вызываемые небιологическим восстановлением ацетилена. При более длительном воздействии эти помехи можно уменьшить путем правильной постановки контроля. Хотя никакая другая система быстрого восстановления ацетилена, кроме нитрогеназы, неизвестна, важно проверить ее наличие путем подавления реакции аммиаком [96].

Поскольку азотфиксация осуществляется как аэробными, так и анаэробными бактериями, схема эксперимента может быть различной [96]. Большое значение имеют правильные условия инкубации, включая освещение и температуру. Определение активности нитрогеназы для систематики бактерий рассматривается в разд. 20.2.7, где продолжено обсуждение этого вопроса ¹⁾.

Оборудование и реактивы

Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и соответствующей колонкой для определения ацетилена и этилена.

Пластмассовые шприцы и соответствующие иглы.

Шприц с тефлоновым поршнем, открывающийся для отбора пробы газа и закрывающийся для удержания в нем пробы.

Высокоочищенный поставляемый фирмами ацетилен в инертном газе (1—4%, по объему). (*Предупреждение!* Баллон с газом должен быть фиксирован у стола. Редуктор должен соответствовать баллону.)

¹⁾ В отдельных случаях методика с восстановлением ацетилена для определения нитрогеназы неприменима, например в присутствии метана, который утилизируют некоторые бактерии. — *Прим. ред.*

Методика

Чистые или накопительные культуры выращивают в колбах или пробирках со средой, не содержащей азота. Наилучшие результаты получают с аэробными культурами, которые имеют лишь слабую мутность. Объем газа над средой в колбе или пробирке должен превышать объем жидкости в 5—10 раз. До добавления ацетилена сосуды следует герметически закрывать. Ацетилен добавляют до конечного давления 0,05—0,10 атм, что эквивалентно насыщению нитрогеназы при 0,8 атм N_2 [85].

Состав остальных компонентов газовой фазы зависит от типа исследуемых бактерий (аэробного или анаэробного). Для стандартизации вводимого ацетилена и обнаружения небιологического восстановления ацетилена аналогичные операции проводят со стерильными средами или со средами, содержащими клетки, убитые формальдегидом. Отбираемые из них пробы тестируют на ацетилен и этилен немедленно после инкубационного периода.

Этилен определяют с помощью газового хроматографа после нескольких часов инкубации при соответствующих освещении и температуре (для чистых культур обычно достаточно 3 ч) в отбираемых из газовой фазы пробах (50 мкл). Времена удерживания для ацетилена и этилена устанавливают либо согласно инструкции фирмы-изготовителя или поставщика материала насадки, либо с помощью стандартов ацетилена и этилена. Количество образующегося этилена определяют по высоте пика (учитывая настройку диапазона и регулятора чувствительности хроматографа) в сравнении со стандартом. Оно должно быть равно количеству восстановленного ацетилена, если установлено, что образующийся этилен не является естественным побочным продуктом метаболизма исследуемых микроорганизмов. Для определения количества молей фиксированного N_2 следует разделить число молей восстановленного C_2H_2 на 3 — результат будет соответствовать потребности в электронах для образования из N_2 аммиака.

Применение методики

Эту методику применяют для чистых или накопительных культур азотфиксирующих микроорганизмов. Описана также модификация этой методики для ферментных препаратов [96].

17.6.11. Специфические азотсодержащие соединения

Специфический качественный и количественный анализ азотсодержащих соединений, таких, как пептиды, нуклеиновые кислоты, пестициды и загрязняющие вещества, можно осуществлять с помощью масс-спектрометрии. Достоинствами этого метода являются его специфичность, возможность обнаружения малых количеств вещества и использования небольшого количества пробы (микрограммов или микролитров), а также возможность определения вещества в любом состоянии — газообразном, жидком и твердом. Основной его недостаток заключается в том, что для него необходимо специальное оборудование, а обработка полученных данных имеет свои трудности. Теория и применение масс-спектрометрии подробно описаны в ряде работ [69, 72, 74].

17.7. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ И СПИРТЫ

Органические кислоты и спирты с короткими цепями образуются в бактериях в качестве промежуточных или конечных продуктов цикла лимонной кислоты, гликолиза и других путей метаболизма. Эти соединения накапливаются в цитоплазме или выделяются в среду. В клетках бактерий они обнаруживаются в низкомолекулярной надосадочной фракции после осаждения макромолекул охлажденной ТХУ (рис. 17.1 в разд. 17.1). Эта фракция включает ацетат, ацетоацетат, β -оксибутират, цитрат-изоцитрат, α -кетоглутарат, формиат, лактат, сукцинат, пируват, малат, фумарат, этанол и многие другие вещества.

Низкомолекулярные вещества анализируют с помощью ионообменной (разд. 16.3.1), абсорбционной (разд. 18.5.2) или — что лучше всего — газожидкостной распределительной хроматографии (разд. 16.3.4). Лактат можно также анализировать ферментативным или колориметрическим методом (разд. 17.2.8).

17.8. ЭЛЕМЕНТЫ

Содержание различных элементов в бактериальных клетках и биологическая роль микроэлементов обсуждаются в работах [107, 109]; приготовление и хранение проб для анализа различных элементов описано в работах [107, 111]. Содержание металлов в пробах, представляющих интерес для бактериологов, определяют с помощью колориметрических методов, метода атомной абсорбции, фотометрии, спектрофотометрии, пламенно-эмиссионной фотометрии, ядерно-активационного анализа, ионселективных электродов, а также другими способами. Эти и другие методы определения металлов описаны в работах [106—109].

Некоторые элементы, например кальций, определяют с помощью быстрой и удобной методики, которая основана на титриметрии и не требует специального оборудования. Элементы, мешающие определению, а также соединения, присутствующие в малых количествах, иногда удаляют соответствующей обработкой пробы. Такие методики описаны в работах [109, 110].

Метод пламенно-эмиссионной фотометрии [107, 108] идеально подходит для анализа щелочных и щелочно-земельных металлов. С помощью атомно-абсорбционной спектроскопии можно обнаруживать миллионные доли приблизительно 40 элементов в различных образцах [107]. Принципы этих методов обсуждаются в работах [107, 108]. Некоторые металлы анализируют точным и относительно удобным методом атомной абсорбции [106, 108]. Для этого метода требуется специальный спектрофотометр, на котором может работать лишь опытный персонал. Присутствие в образце нескольких элементов и соединений мешает атомно-абсорбционному анализу исследуемого элемента, но при правильной обработке образца влияние помех уменьшается или может быть совсем устранено.

Ядерно-активационный анализ [108] основан на облучении образца с целью получения одного или нескольких радиоактивных элементов. Радиоактивные образцы идентифицируют и измеряют их количество. Преимуществами этого вида элементного анализа являются высокая чувствительность и возможность определения многих элементов в одном небольшом образце. Для применения этого метода необходимы источник нейтронов с высокой энергией (ядерный реактор или ускоритель), сложное оборудование для обнаружения изотопов, соответствующий компьютер и опытный персонал. При наличии необходимого оборудования применение этого метода требует относительно меньших затрат времени и средств, чем другие, если одновременно определяют несколько элементов в одном образце. Это особенно важно в случае, когда количество анализируемого материала ограничено.

Рентгеновская эмиссионная спектроскопия [108] является методом анализа, позволяющим количественно определять и идентифицировать некоторые элементы, присутствующие в биологическом материале в большом количестве, причем исследуемый материал при этом не разрушается. Рентгеновский микроанализ с применением электронно-лучевого зонда используют для определения количества и местоположения некоторых элементов *in situ*. Разрешение анализа позволяет применять его по отношению к отдельным бактериальным клеткам и спорам [112]. Этот метод также требует сложного оборудования и специальной подготовки персонала, поэтому он доступен обычно лишь научно-исследовательским лабораториям.

Описаны методы колориметрического и нефелометрического определения металлов и неорганических соединений, включая автоматизированный анализ [109]; они опубликованы также в материалах Управления США по защите окружающей среды [110].

Имеющиеся в продаже ион-селективные электроды также представляют собой очень удобное и недорогое средство определения многих элементов, правда, их применение ограничено несколькими типами образцов и элементов (разд. 16.2.2).

17.9. ЛИТЕРАТУРА

Фракционирование и радиоактивность

1. Kennell D. *Methods Enzymol.*, **12A**, 686—692 (1967).
2. Roberts R. B., Cowie D. B., Bolton E. T., Abelson P. H., Britten R. J. *Biosynthesis in Escherichia coli*. Carnegie Inst. Washington Publ., 607, 1955.
3. Sutherland I. W., Wilkinson J. F. In: J. R. Norris and Ribbons D. W. (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 5B, p. 346—383, Academic Press, Inc., New York, 1971.

Углеводы

Общая литература

4. Colowick J., Kaplan N. (ed.), *Methods Enzymol.*, **8**, 1—759 (1966).
5. Herbert D., Phipps P. J., Strange R. E. In: R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 5B, p. 209—344, Academic Press, Inc., New York, 1971.
6. Work E. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 5A, p. 361—418, Academic Press, Inc., New York, 1971.

Специальная литература

7. Dische Z. *J. Biol. Chem.*, **204**, 983—997 (1953).
8. Dische Z. *Methods Carbohydr. Chem.*, **1**, 477—514 (1962).
9. Elson L. A., Morgan W. T. *Biochem. J.*, **27**, 1824—1828 (1933).
10. Fox G. E., Magrum E. J., Balch W. E., Wolfe R. S., Woese C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4537 (1977).
11. Ghuysen J.-M., Tipper D. J., Strominger J. L. *Methods Enzymol.*, **12A**, 695—699 (1966).
12. Hadzija O. *Anal. Biochem.*, **60**, 512—517 (1974).
13. Osborn M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **50**, 499—506 (1963).
14. Rondle C. J. M., Morgan W. T. J. *Biochem. J.*, **61**, 586—590 (1955).
15. Stewart-Tull D. E. S. *Biochem. J.*, **109**, 13—18 (1968).
16. Sweeley C. C., Wells W. W., Bentley R. *Methods Enzymol.*, **8**, 95—107 (1966).
17. Tipper D. J. *Biochemistry*, **7**, 1441—1449 (1968).
18. Weisbach A., Hurwitz J. *J. Biol. Chem.*, **234**, 705—712 (1959).

Липиды

Общая литература

19. Dittmer J. C., Wells M. A. *Methods Enzymol.*, **14**, 482—530 (1969).
20. Kates M. In: T. S. Work and S. Work (ed.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol. 3, p. 269—610, American Elsevier Publishing Co., Inc., New York, 1972.

21. O'Leary W. In: A. I. Laskin, H. A. Lechevalier (ed.), Handbook of microbiology, vol. 2, p. 275—327. Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1974.

Специальная литература

22. Bird C. W., Lynch J. M., Pirt S. J., Reid W. W., Brooks C. J., Middleditch B. S. Science, **230**, 473—474 (1971).
23. Bligh E. G., Dyer W. J. Can. J. Biochem. Physiol., **37**, 911—917 (1951).
24. Folch J. J. Biol. Chem., **266**, 497—509 (1957).
25. Hara A., Radin N. S. Anal. Biochem., **90**, 420—426 (1978).
26. Johnson A. R., Stocks R. B. In: A. R. Johnson and J. B. Davenport (ed.), Biochemistry and methodology of lipids, p. 195—218, Wiley Interscience, New York, 1971.
27. Law J. H., Slepecky R. A. J. Bacteriol., **82**, 33—36 (1961).
28. Patt T. E., Hanson R. S. J. Bacteriol., **134**, 634—636 (1978).
29. Patton J. C., McMurchie E. J., May B. K., Elliot W. H. J. Bacteriol., **136**, 754—759 (1978).
30. Rilfors L., Wieslander A., Stahl S. J. Bacteriol., **135**, 1043—1052 (1978).
31. Skipski V. P., Barklay M. Methods Enzymol., **14**, 541—548 (1969).
32. Stein R. A., Stawson V., Mead J. F. In: G. V. Marinetti (ed.), Lipid chromatographic analysis, 2nd ed., p. 857—896, Marcel Dekker, Inc., New York, 1976.
33. Vorbeck M. L., Marinetti G. V. Biochemistry, **4**, 296—305 (1965).
34. Wuthier R. E. Lipid Res., **7**, 558—561 (1966).

Полимеры клеточной стенки

Общая литература

35. Braun V. Symp. Soc. Gen. Microbiol., **28**, 111—138 (1978).
36. Braun V., Hantke K. Annu. Rev. Biochem., **43**, 89—121 (1974).
37. Costerton J. W., Ingram J. M., Cheng K. J. Bacteriol. Rev., **38**, 87—110 (1974).
38. Cummins C. S. In: A. I. Laskin and H. A. Lechevalier (ed.), Handbook of microbiology, vol. 2, Microbial composition, p. 251—284, Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1974.
39. Elin R. J., Wolff S. M. In: A. I. Laskin and H. A. Lechevalier (ed.), Handbook of microbiology, vol. 2, Microbial composition, p. 674—731, Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1974.
40. Ghuysen J.-M. Bacteriol. Rev., **32**, 425—464 (1968).
41. Leive L. (ed.). Bacterial membranes and walls, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973.
42. Luderitz O., Staub A. M., Westphal O. Bacteriol. Rev., **30**, 192 (1966).
43. Milner K. C., Rudbach J. A., Ribi E. In: G. Weinbaum, S. Kadis, and S. Ajl (ed.), Microbial toxins, vol. 4, p. 1, Academic Press, Inc., New York, 1971.
44. Reaveley D. A., Burge R. E. Adv. Microb. Physiol., **7**, 1—81 (1972).

45. Rogers H. J., Ward J. B., Burdett I. D. J. Symp. Soc. Gen. Microbiol., **28**, 139—176 (1978).
46. Schleifer K. H., Kandler O. Bacteriol. Rev., **36**, 407—477 (1972).

Специальная литература

47. Davidson A. L., Badiley J. Nature (London), **202**, 874 (1964).
48. Ghuysen J. M., Tipper D., Strominger J. L. Biochemistry, **4**, 2245—2256 (1965).
49. Kandler O., Konig H. Arch. Microbiol., **118**, 141—152 (1978).
50. Knox K. W. Biochem. J., **100**, 73—78 (1966).
51. Kottel R. H., Bacon K., Clutter D., White D. J. Bacteriol., **124**, 550—557 (1975).
52. Osborn M. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **50**, 499—514 (1963).
53. Strominger J. L., Tipper D. J. In: E. F. Osserman, R. E. Canfield, and S. Beychak (ed.), Symposium on Lysoenzyme, 1975.
54. Taylor A., Knox K. W., Work E. Biochem. J., **99**, 53—61 (1966).
55. Warth A. W., Strominger J. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **64**, 528—535 (1969).
56. Weidel W., Frank H., Martin H. H. J. Gen. Microbiol., **22**, 158—166 (1960).
57. Westphal O., Jan K. Methods Carbohydr. Chem., **5**, 83—91 (1965).
58. Work E. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. **5A**, p. 361—418, Academic Press, Inc., New York, 1971.

Нуклеиновые кислоты

Общая литература

59. DeLey J. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. **5A**, p. 301—311, Academic Press, Inc., New York, 1971.
60. Parish J. H. Principles and practice of experiments with nucleic acids, Longman Group, Ltd., London, 1972.

Специальная литература

61. Burton K. Biochem. J., **62**, 315—323 (1957).
62. Griswold B. C., Humoller F. L., McIntyre A. R. Anal. Chem., **23**, 192—194 (1951).
63. Zahn R. Z. FEBS Lett., **6**, 141 (1970).

Азотсодержащие компоненты

Общая литература

64. Allen S. E., Grimshaw H. M., Parkinson J. A., Quarmby C. In: S. E. Allen (ed.), Chemical analysis of ecological materials, p. 184—206, Blackwell Scientific Publications, London, 1974.
65. Black C. A. (ed.). Methods of soil analysis, part 2, Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wis., 1965.

66. *Bremner J. M., Keeney D. R.* Anal. Chim. Acta, **32**, 485—495 (1965).
67. *Cooper T. G.* The tools of biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1965.
68. *Franson M. A. (ed.)*. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th ed., American Public Health Association, Washington, D. C., 1976.
69. *Gudinowicz B. J., Gudinowicz M. J., Martin H. F.* Fundamentals of integrated GC-MS. Part II. Mass spectrometry. Marcel Dekker, Inc., New York, 1976.
70. *Horowitz W. (ed.)*. Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists, 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., 1975.
71. *Jackson M. L.* Soil chemical analysis, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1958.
72. *Safe S., Hutzinger O.* Mass spectrometry of pesticides and pollutants. CRC Press, Cleveland, Ohio, 1973.
73. *Strickland J. D. H., Parsons T. R.* A practical handbook of seawater analysis, Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, 1960.
74. *Waller G. R. (ed.)*. Biochemical applications of mass spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1972.

Специальная литература

75. *Armstrong F. A.* Anal. Chem., **35**, 1292 (1963).
76. *Baca P., Freiser H.* Anal. Chem., **49**, 2249—2250.
77. *Bohler P., Stein S., Dairman W., Udenfriend S.* Arch. Biochem. Biophys., **155**, 213—220 (1973).
78. *Bradford M. M.* Anal. Biochem., **72**, 248—254 (1976).
79. *Bremner J. M. J.* Agric. Sci., **55**, 11—33 (1960).
80. *Canney P. J., Armstrong D. E., Wiersma J. H.* Determination of nitrite and nitrate ions in natural waters using aromatics or diamines as reagents. Technical Report, University of Wisconsin, Water Resources Center, Madison, 1974.
81. *Chow T. J., Johnstone M. S.* Anal. Chim. Acta, **27**, 441—446 (1962).
82. *Coakley W. T., James C. J.* Anal. Biochem., **85**, 90—97 (1978).
83. *Gornall A. G., Bardwill C. S., David M. M. J.* Biol. Chem., **177**, 751—756 (1949).
84. *Guiraud G., Fardeau J. C., Llimous G., Barral M. A.* Ann. Agron., **28**, 329—333 (1977).
85. *Hardy R. W. F., Gibson A. H. (ed.)*. A treatise on dinitrogen fixation. Section IV. Agronomy and ecology. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1977.
86. *Kalb V. F. Jr., Bernlohr R. W.* Anal. Biochem., **82**, 362—371 (1977).
87. *Kalckar H. M. J.* Biol. Chem., **167**, 429—475 (1947).
88. *Kruse J. M., Mellon M. G.* Anal. Chem., **25**, 1188—1192 (1953).
89. *Layne E.* Methods Enzymol., **3**, 447—454 (1957).
90. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J.* Biol. Chem., **193**, 265—275 (1951).
91. *Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. E.* Anal. Biochem., **87**, 207—210 (1978).

92. *Matsunaga K., Nishimura M.* Anal. Chim. Acta, **45**, 350—353 (1969).
93. *Mubarek A., Howald R. A., Woodriff R.* Anal. Chem., **49**, 857—860 (1977).
94. *Nakamura H., Pisano J. J.* Arch. Biochem. Biophys., **172**, 102—105 (1976).
95. *Pierce J., Suelter C. H.* Anal. Biochem., **81**, 478—480 (1977).
96. *Postgate J. R. (ed.)*. The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation, Plenum Press, New York, 1971.
97. *Raganowicz E., Niewiadomy A.* Pol. Arch. Hydrobiol., **23**, 1—4 (1976).
98. *Rexroad P. R., Cathey R. D.* J. Assoc. Off. Anal. Chem., **59**, 1213—1217 (1976).
99. *Russel J. A.* J. Biol. Chem., **156**, 457—461 (1944).
100. *Snell F. D., Snell C. T.* Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Co., Inc., New York, 1945.
101. *Sedmak J. J., Grossberg S. E.* Anal. Biochem., **79**, 544—552 (1977).
102. *Stickland H. L.* J. Gen. Microbiol., **5**, 698—703 (1951).
103. *Tan Y. L.* Anal. Chim. Acta, **91**, 373—374 (1977).
104. *Terado K., Honnami H., Kiba T.* Bull. Chem. Soc. Jpn., **50**, 132—137 (1977).
105. *Warburg O., Christian W.* Biochem. Z., **310**, 384—421 (1942).

Элементы

Общая литература

106. *Christian G. D., Feldman F. J.* Atomic absorption spectroscopy. Applications in agriculture, biology and medicine, Wiley Interscience, New York, 1970.
107. *Herrman R., Alkemade C. T. J.* Chemical analysis by flame photometry, 2nd ed. Translated by P. T. Gilbert, Jr., Interscience Publishers, Inc., New York, 1963.
108. *Morrison G. H. (ed.)*. Trace analysis. Interscience Publishers, Inc., New York, 1956.
109. *Snell D. S., Snell C. T.* Colorimetric methods of analysis, vol. 2, 3rd ed. D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, N. J., 1963.
110. U. S. Environmental Protection Agency. Methods for chemical analysis water and wastes, Office of Technology Transfer, Washington, D. C., 1974.
111. *Weinberg E. D. (ed.)*. Microorganisms and minerals. Marcel Dekker, Inc., New York, 1977.

Специальная литература

112. *Stewart M., Somlyo A. P., Somlyo A. V., Shuman H., Lindsay J. A., Murrell W. G. J.* Bacteriol., **143**, 481—491 (1980).

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

В. Доброгоч

Впервые один из ферментов был закристаллизован Самнером в 1926 г. В последующие годы знания об этих незаменимых биологических катализаторах накапливались с поразительной быстротой. Достижения биохимии широко используются в энзимологических исследованиях, благодаря чему мы можем сегодня обнаруживать и количественно определять сотни ферментов как в эукариотических, так и в прокариотических клетках. В некоторых случаях возможно обнаружение в клетке всего нескольких молекул фермента и измерение скоростей реакций, протекающих за микросекунды. Пожалуй, изучение отдельных ферментов и ферментных систем больше, чем какие-либо другие биохимические исследования, способствовали лучшему пониманию фундаментальных биоэнергетических и биосинтетических процессов, лежащих в основе всего живого.

Бактериальные системы играют ключевую роль почти на всех этапах энзимологического исследования, и современный бактериолог обязательно должен обладать знаниями в области теоретической и практической энзимологии. Это справедливо независимо от того, чем именно интересуется данный исследователь: вопросами общего характера или вопросами, связанными с медициной, сельским хозяйством, промышленностью и т. п.

Сознавая это, следует также согласиться с тем, что знания в области энзимологии нельзя получить с помощью одного лишь экскурса в предмет. Данная глава преследует две цели: во-первых, дать читателю общее целостное представление о практическом аспекте изучения ферментных систем бактерий и, во-вторых, рассмотреть некоторые специальные лабораторные методы, с помощью которых можно изучать функционирование, образование и регуляцию бактериальных ферментов.

В разд. 18.1 рассматриваются различные типы клеточных препаратов, обычно используемых в энзимологических исследованиях, после чего следует описание того, как измеряется активность ферментов вообще и ферментов шести основных классов в частности (разд. 18.2). С помощью ферментов можно изучать различные процессы регуляции, связанные с изменениями их активности: в разд. 18.3 рассматриваются эти процессы в целом, а также два основных типа регуляции — аллостерический и путем ковалентной модификации. Присутствие и отсутствие тех или иных ферментов у определенной бактерии зависит, разумеется, от ее генотипа. Но даже если у бактерии имеются определенные гены, их транскрипция и трансляция с образованием соответствующих молекул фермента могут и не происходить. Здесь следует учитывать факторы, участвующие в регуляции генетической экспрессии и, следовательно, синтеза ферментов, рассмотренные в разд. 18.4. И наконец, поскольку ферментативные реакции редко протекают в бактериальных клетках как изолированные процессы и чаще всего являются частью сложной сети метаболических путей и циклов с взаимозависимыми этапами, мы сочли нужным рассмотреть здесь некоторые общие и специальные методы анализа путей метаболизма (разд. 18.5).

В настоящее время существует много различных методов изучения метаболизма бактерий, рассмотрение которых следовало бы включить в эту главу. Здесь было бы полезно, например, обсудить методы, применяемые для идентификации и количественного определения различных ферментов дыхательной цепи, участвующих в образовании взаимосвязанных путей, через которые идет поток электронов и образуются хемиосмотические градиенты. Интересно было бы рассмотреть также общие методы анализа специфических катаболических и анаболических процессов. К сожалению, объем данной книги не позволяет включить описание этих и многих других методов.

В данной главе используются следующие общепринятые сокращения: сАМР — циклический аденозин-3',5'-монофосфат; АМР, АДР и АТР — аденозинмоно-, аденозинди- и аденозинтрифосфат соответственно; Ф-6-Р —

фруктозо-6-фосфат; ФДФ — фруктозо-1,6-дифосфат; Г-6-Р — глюкозо-6-фосфат; GDP и GTP — гуанозиндигуанозинтрифосфат соответственно; ЭДТА — этилендиаминтетраацетат; NAD и NADH — окисленный и восстановленный никотинамидадепиндинуклеотид соответственно; NADPH — восстановленный никотинамидадепиндинуклеотидфосфат; трис — трис-(гидроксиметил)-аминометан.

18.1. ПОДГОТОВКА КЛЕТОК

Конечной целью изучения ферментных систем бактерий является получение исчерпывающей информации о различных реакциях, протекающих в клетках, которая позволила бы понять, как эти реакции вплетены в ткань жизненных процессов. В идеале такие исследования должны проводиться на растущих клетках с интактной структурой и ненарушенным метаболизмом. Во многих случаях это удастся осуществить, однако чаще всего приходится использовать менее идеальный источник получения клеточных компонентов.

Прежде всего исследователь должен решить, какой тип препарата больше всего соответствует целям эксперимента. И, хотя уже проведено огромное количество экспериментов на сотнях различных штаммов бактерий, очень трудно сформулировать какие-либо определенные рекомендации относительно выбора «наилучшего» метода. Здесь применимо только правило оптимального выбора: использовать препараты дезинтегрированных клеток в тех случаях, когда их невозможно сделать проницаемыми, и делать клетки проницаемыми, если нет возможности работать с интактными покоящимися или растущими клетками.

18.1.1. Интактные клетки

Растущие клетки

Все основные жизненные процессы, протекающие в активно растущих бактериях, включая размножение, имеют высокоорганизованный и строго регулируемый характер и во многих отношениях представляют собой

идеальную систему для исследования ферментов. Во время роста клеток все их метаболические системы находятся в подвижном равновесии: питательные вещества и ионы поступают в клетки, а конечные продукты метаболизма выводятся. Во всех случаях, когда это возможно, желательно использовать интактные растущие клетки.

Покоящиеся клетки

Рост клеток можно остановить, если отделить их (путем центрифугирования или фильтрации) от питательной среды и суспендировать в «нейтральной», осмотически подходящей среде, например забуференном физиологическом растворе или минерально-солевой среде, лишенной источников углерода и азота (разд. 25.1). Обработанные таким образом клетки называются покоящимися. Они обладают тем же набором ферментов, что и растущие клетки, но находятся в относительно неактивном состоянии. На таких клетках можно изучать реакции или группы реакций, представляющие особый интерес. Например, можно определять поток электронов, идущий от субстратов, таких, как D-лактат или сукцинат, через систему дыхания в условиях, когда рост и метаболические требования минимальны. Покоящиеся клетки некоторых видов способны синтезировать белки, и их часто используют для изучения этого процесса. Кроме того, покоящиеся клетки служат объектом при изучении транспортных процессов, включая транслокацию субстратов и ионов. С этой целью отмытые клетки обычно суспендируют в осмотически пригодной среде, содержащей для подавления синтеза белка хлорамфеникол (50—100 мкг/мл). При проведении некоторых экспериментов, например связанных с изучением транспорта, часто рекомендуется использование эндогенных источников энергии (разд. 19.2).

Голодающие покоящиеся клетки

Бывают случаи, когда клетки полностью лишают эндогенных источников энергии. Прекрасный пример использования голодающих покоящихся клеток — измере-

ние внутриклеточного АТР, образующегося за счет хемиосмотического мембранного потенциала. В неголодающих клетках выявление АТР, синтезированного за счет хемиосмотического градиента [49], затруднительно из-за высокого фонового уровня АТР. Методика голодания для *E. coli* была разработана Кохом [25]. При ее использовании клетки *E. coli* быстро утилизируют резервные питательные вещества в циклическом процессе фосфорилирования/дефосфорилирования α -метилглюкозида, который у этих бактерий фосфорилируется при участии фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы. Клетки собирают центрифугированием при 4°C и промывают основной средой или 0,12 М трис·HCl, рН 8,0. Затем их суспендируют до плотности 5 мг клеток (сухого веса) на 1 мл основной среды, содержащей 20 мМ α -метилглюкозида и 40 мМ азида натрия, и инкубируют при 37°C от 45 до 120 мин в зависимости от используемого штамма. После этого клетки снова центрифугируют, промывают и ресуспендируют в соответствующем растворе (разд. 25.1).

Более обычный способ подавления эндогенного метаболизма, по крайней мере у аэробов или факультативных аэробов, заключается просто в энергичном аэрировании густой суспензии клеток (в основной среде или буфере) в течение 2—4 ч или дольше, если это необходимо. За сокращением запасов питательных веществ в клетках можно следить, измеряя максимальное снижение эндогенного дыхания $Q(O_2)$ относительно уровня $Q(O_2)$, необходимого для окисления какого-либо субстрата, например глюкозы.

18.1.2. Проницаемость клеток

Работа с интактными клетками имеет свои трудности. Главная трудность заключается в том, что как растущие, так и покоящиеся клетки непроницаемы для большинства субстратов, кофакторов и метаболитов, обычно используемых при определении ферментов. Принято считать, что лучше всего изучать ферментативные реакции в условиях, когда белок-белковые (или белок-мембранные) взаимодействия между молекулами одного фермента (гомологичные взаимодействия) или меж-

ду молекулой данного фермента и молекулой другого белка (гетерологичные взаимодействия) подобны тем, которые существуют *in situ* [42]. Хотя при использовании интактных клеток данное условие выполняется, это малоутешительно, если необходимые субстраты не могут проникать через клеточную мембрану.

Обработка растворителями

Существует ряд методик, позволяющих более или менее успешно Делать целые клетки более проницаемыми и тем самым использовать их для исследования ферментов. Например, при обработке клеток *E. coli* растворителями (толуолом или бензолом) они становятся проницаемыми для β -галактозидов, которые проникают в клетки и подвергаются гидролизу β -галактозидазой [4]. Растворители применяются также при определении фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы у *E. coli* [17]. Для обработки клеток используются также различные растворы толуола в этаноле. Иногда такая обработка сопровождается замораживанием и оттаиванием клеток [6].

Обработка хелатообразующими агентами

Обработка энтеробактерий хелатообразующим агентом (трис-ЭДТА) была успешно применена для того, чтобы сделать их проницаемыми и, следовательно, чувствительными к актиномицину D [26]. Рекомендуются [42] шире применять такую обработку при изучении сложных систем, таких, как ферменты, связанные с мембранами, и ферменты взаимопревращения. Более того, везде, где это возможно, следует сравнивать ферментативные активности обработанных и интактных клеток.

18.1.3. Препараты дезинтегрированных клеток

Во многих случаях целые клетки, как проницаемые, так и непроницаемые, бывают непригодны или слишком сложны для исследований, и тогда приходится прибегать к дезинтегрированным клеточным препаратам.

Впервые работа с использованием таких препаратов в качестве источника ферментов была опубликована в 1897 г. Бюхнером. Эксперименты Бюхнера называют «одними из основополагающих экспериментов в современной биохимии, стоящими в одном ряду с опытами Лавуазье в химии» [22].

Методы дезинтеграции бактериальных клеток уже обсуждались в настоящем руководстве в связи с выделением клеточных структур (разд. 5.1)

Разрушение клеток под действием осмотических сил

Бактериальные клетки разрушают различными способами. Пожалуй, самым мягким из всех механических способов разрушения клеток является разрушение клеточной мембраны под действием гидростатического (осмотического) давления. Для большинства бактерий этот метод неприменим, если не обрабатывать предварительно клеточные стенки ферментами или не изменять их структуру другими способами.

Применение осмотического шока оказалось очень полезным при изучении некоторых ферментов грамотрицательных бактерий. Эти ферменты локализуются между плазматической мембраной и наружными слоями клеточной стенки в периплазматическом пространстве, и поэтому их называют «периплазматическими» ферментами [32, 33]. Обычно это гидролазы, такие, как щелочная фосфатаза, рибонуклеаза I и циклическая фосфодиэстераза. Метод выделения этих ферментов из клеток *E. coli* описан Хьюзом и др. [22]. Он включает следующие этапы: 1) тщательное промывание клеток свежей средой или соответствующими буферами; 2) суспендирование промытого осадка клеток в растворе 0,5 М сахарозы (80 частей); 3) центрифугирование и декантирование надосадочной фракции; 4) быстрое диспергирование осадка путем сильного встряхивания в холодном $5 \cdot 10^{-4}$ М растворе $MgCl_2$ (80 частей); 5) центрифугирование и изучение надосадочной фракции с целью выявления периплазматических ферментов.

Обработка смесью лизоцим — ЭДТА также является прекрасным способом быстрого и мягкого лизиса грам-

отрицательных клеток. Ее проводят при низкой или комнатной температуре. В осмотически щадящей среде (для того, чтобы не произошло полного разрушения клеток) при этом образуются сферопласты. Таким способом можно одновременно обрабатывать до 30 л клеток. С помощью этой мягкой обработки можно выделить всю фракцию полирибосом. Для оптимального разрушения клеток бактерий различных видов используют разные концентрации растворов буфера, ЭДТА и лизоцима. Приведенная ниже методика первоначально была описана Репаске [37] для разрушения клеток *E. coli*. Промытые клетки суспендируют в 3 мл смеси, содержащей 100 М трис·HCl, pH 8,0, 0,8 мг ЭДТА, pH 7,5, 50 мкг лизоцима и воду. Лизис начинается после добавления лизоцима; его можно проводить при комнатной температуре в течение 5 мин или же на холоду.

Мягкая осмотическая обработка применяется также при выделении протопластов и мембранных везикул грамположительных бактерий. Выделенные с ее помощью препараты чрезвычайно полезны при изучении транспорта веществ через бактериальную мембрану. Способы их получения обсуждаются и описываются в следующей главе (разд. 19.3).

Дезинтеграция

Опубликованы обзоры по различным физическим и химическим методам дезинтеграции бактериальных клеток [6, 22]. В них, особенно во втором, читатель найдет более подробную информацию, касающуюся применения этих методов. Из всех имеющихся средств эффективными для разрушения клеток бактерий (и дрожжей) являются пресс Френча или подобные ему устройства, вибрационные мельницы, ультразвуковые дезинтеграторы, некоторые ручные мельницы и пресс Хьюза. Большинство других устройств предназначено для специальных целей или же эффективно при обработке организмов, которые разрушаются легче, чем бактерии (например, ткани простейших или ткани животных). Наиболее полезный и эффективный химический способ дезинтеграции клеток включает использование литических агентов (таких, как лизоцим или лизоцим в сочетании

с хелатобразующими агентами, например ЭДТА). Ниже кратко описаны наиболее подходящие приборы, используемые в настоящее время для разрушения клеток в бактериальной энзимологии.

Пресс Френча. Пресс Френча — очень эффективное устройство для разрушения клеток многих видов микроорганизмов. В продаже имеется много вариантов этого устройства. Простейшее из них состоит из камеры, помещенной в лабораторный гидравлический пресс, способный создавать общее давление 10—20 т. В камеру вносят клеточную суспензию, которую подвергают действию поршня. Клетки эффективно разрушаются при выходе суспензии под давлением из маленького отверстия камеры. Одной рукой можно регулировать давление гидравлического прессы, а другой скорость выталкивания клеток через игольчатый клапан. В продаже имеется устройство с автоматическим гидравлическим прессом (American Instrument Co., Silver Spring, Md.), а также усовершенствованный вариант этого устройства (Sorvall — Ribi Fractionator, Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Conn.).

Предварительно охлажденный пресс Френча заполняют суспензией клеток. Поршень заранее устанавливают таким образом, чтобы объем камеры был равен 5, 10, 20 или 50 мл. Систему устанавливают (с поршнем в нижнем положении) на специальный штатив, добавляют немного избыточного количества суспензии клеток и открывают игольчатый клапан, чтобы при закрывании крышки камеры избыточная жидкость выливалась через отверстие. (Это обеспечивает вытеснение воздуха из камеры и предотвращает выход сжатого воздуха вместе с последней порцией суспензии.) Закрывают игольчатый клапан и собранный аппарат помещают (с поршнем в нижнем положении) на гидравлический пресс. Подают давление $6,8 \cdot 10^7$ — $20,4 \cdot 10^7$ Па и поддерживают его на постоянном уровне во время медленного просачивания суспензии через соединенную с отверстием трубку в соответствующий охлажденный приемник.

Этим методом можно разрушать большинство бактерий, даже те, которые разрушаются особенно трудно, например микобактерии. Суспензию грамотрицательных

кокков часто требуется пропускать через пресс повторно. Помимо того что этот способ разрушения очень удобен и эффективен, он имеет еще одно достоинство: при его использовании инактивация ферментов минимальна. Рекомендуется использовать относительно густые суспензии клеток: около 0,5 г клеток (сырого веса) или больше в 1 мл [22]. В густых суспензиях разрушение клеток происходит лучше, а инактивация ферментов меньше, чем в разбавленных.

Вибрационные мельницы. Наиболее часто используются вибрационные мельницы марки Mickle (Mickle Ltd., Mill Works, Yomshall, Surrey, England) и Nossal (McDonald Engineering Co., Bay Village, Ohio). Недорогую вибрационную мельницу для небольших объемов клеток можно изготовить с помощью зубного амальгаматора (например, модель LP-60, Crescent Co., Lyons Ill.). К суспензии клеток добавляют мелкие стеклянные шарики (Superbrite glass beads, grade 110, Minnesota Mining and Manufacturing Co., Minneapolis Minn. или Ballotini Beads, English Glass Co., Ltd., Leicester, England) и смесь помещают в стеклянную или металлическую капсулу, поставляемую фирмой-изготовителем. Для оптимального разрушения эмпирически подбирают соотношение объемов шариков и клеток, которое обычно равно 1:1. Объемы смеси, как правило, не превышают 25 мл. Для обработки с помощью мельницы Mickle требуется длительное встряхивание. Меньшее время затрачивается при работе с мельницей Nossal с повышенной вибрацией. Во время встряхивания образуется тепло, поэтому применяют какую-либо охлаждающую систему. Для охлаждения мельницы Nossal, например, используют систему с CO_2 .

Обработка ультразвуком. Разрушение клеток ультразвуком обусловлено кавитационными силами, создающими ударные волны или кавитационный микропоток, что способствует химической атаке свободными радикалами. Каким бы ни был механизм дезинтеграции, ультразвуковая обработка — очень эффективное средство разрушения бактериальных клеток. В продаже имеются различные ультразвуковые дезинтеграторы.

Хотя можно обрабатывать и относительно густые суспензии клеток, эффективность разрушения в вязких

растворах значительно снижается. По мере выхода крупных молекул, например ДНК, суспензия становится более вязкой и разрушение клеток ухудшается. Более разбавленные клеточные суспензии быстрее разрушаются ультразвуком. Время обработки обычно определяют эмпирически, учитывая необходимость отвода выделяющегося тепла, а также чувствительность ферментов к инактивации.

Клеточную суспензию охлаждают, помещая сосуд, в котором она находится, в лед или смесь льда с солью, или же холодной водой, циркулирующей между двойными стенками сосуда. Кончик датчика прибора опускают на несколько миллиметров ниже поверхности жидкости. Затем устанавливают генератор на рекомендуемую мощность и настраивают прибор на нужную частоту (резкий шипящий звук соответствует наиболее эффективному разрушению клеток). После необходимого периода обработки изменяют подаваемую частоту и выключают прибор. Для заглушения шума, издаваемого прибором, рекомендуется создать акустическую защиту вокруг датчика.

По-видимому, ультразвуковая обработка — наиболее быстрый и легкий способ разрушения клеток. Еще одно его достоинство заключается в том, что с его помощью эффективно разрушаются самые различные бактерии. Все это позволяет широко применять этот способ в бактериологических исследованиях.

Растирание клеток с окисью алюминия. Это один из наиболее дешевых способов разрушения бактерий. Для него необходимы лишь ступка, пестик и порошок окиси алюминия (например Polishing Alumina, grade A-301, Fischer Scientific Co.). Окись алюминия промывают и высушивают при 100°C. Замороженный (или охлажденный) осадок клеток помещают в охлажденную ступку. Соотношение охлажденной окиси алюминия и клеточной массы — 1 : 2 (по весу). Энергично растирают смесь 2—5 мин. За это время порошкообразная смесь превращается в липкую, клееобразную массу, что свидетельствует о разрушении клеток. Добавляют соответствующий буфер, ресуспендируют содержимое ступки и центрифугируют его для удаления окиси алюминия и неразрушенных клеток. Этим способом можно быстро разру-

шить относительно большое количество клеток. Большинство бактерий, однако, эффективнее разрушается другими методами.

Пресс Хьюза. Намного более эффективный способ разрушения бактерий описан Хьюзом и др. [22]. Он основан на сдвиговых усилиях, возникающих под действием кристаллов льда внутри клеток или абразивного порошка на поверхности клеток. Пресс Хьюза состоит из устройства для пропускания замороженной клеточной суспензии или пасты из клеток (с добавлением абразивного материала, например равного объема пирексового стеклянного порошка, или без него) через небольшое отверстие в приемную камеру. Суспензию пропускают под высоким давлением ($6,8 \cdot 10^7$ — $54,4 \cdot 10^7$ Па), создаваемым гидравлическим прессом. Существует несколько модификаций исходного пресса Хьюза.

Пресс охлаждают в морозильнике или с помощью сухого льда от -25 до -30°C . В камеру помещают суспензию или замороженный осадок клеток. Устанавливают поршень над суспензией и подают давление до тех пор, пока она не пройдет через маленькое отверстие в приемник.

Разрушение клеток в замороженном виде с помощью пресса Хьюза — один из наиболее эффективных способов разрушения клеточного материала разного происхождения: от бактериофагов до животных тканей. С его помощью можно разрушать клетки бактерий, обычно трудно поддающиеся разрушению (например, грамположительных кокков).

В общем наиболее распространенные физические методы разрушения клеток можно классифицировать следующим образом в порядке уменьшения их дезинтегрирующего действия: пресс Хьюза > вибрационные мельницы > пресс Френча > ультразвук > растирание с окисью алюминия. По устойчивости к разрушению клетки различных микроорганизмов можно расположить в последовательности (в порядке уменьшения): дрожжи > > мицелий грибов > грамположительные кокки > грамположительные палочки > грамотрицательные палочки > галобактерии > микоплазмы.

Способ разрушения клеток выбирают в основном эмпирически в зависимости от вида клеток, нужного объ-

ема экстракта, чувствительности фермента(ов) к инактивации или изменению в процессе разрушения и необходимости последующего хранения. Часто это приходится делать методом проб и ошибок.

18.2. ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ

18.2.1. Общие замечания

Метод определения активности фермента должен быть по возможности точным, чувствительным, непрерывным, удобным и специфическим для изучаемой реакции. Однако чаще всего выполняются далеко не все эти требования. Поэтому, прежде чем признать метод пригодным для использования, необходимо провести многочисленные контрольные и стандартные тесты. Ниже приведено краткое описание этих тестов.

Изменяющиеся условия эксперимента

В большинстве случаев для определения активности ферментов каждого определенного вида организма нужны специальные условия. Нельзя применять один и тот же метод для изучения ферментов одного типа у различных видов бактерий. От вида к виду могут сильно различаться потребности бактерий в ионах и кофакторах, оптимумы рН и температуры, значения K_m , чувствительности к ингибиторам и равновесия реакций. Классический пример такого типа вариаций — бактериальная сукцинатдегидрогеназа: условия определения активности этого фермента настолько варьируют, что авторы часто не указывают состав реакционной смеси [35].

Подавление активности

Если в неочищенном экстракте ферментативная активность не обнаруживается, это еще не означает, что организм, из которого приготовлен экстракт, не содержит этот фермент. Частичная или полная потеря активности фермента, присущей данному микроорганизму, может произойти во время приготовления экстракта. Внутри клетки фермент защищен от инактивации окси-

дантами и другими веществами окружающей средой и многочисленными белок-белковыми взаимодействиями, которые нарушаются в результате разрушения клеток. В связи с этим следует отметить, что содержание белка в большинстве клеток превышает 100 мг/мл [28]. Однако чаще всего в анализах *in vitro* используют разбавленные водные растворы ферментов, так как в этих условиях легче осуществлять контроль в процессе эксперимента.

Особенно важно учитывать влияние концентрации белка на активность фермента при изучении регуляторных ферментов [28].

Если предполагают, что причиной инактивации фермента является его чувствительность к кислороду, перед разрушением клеток в среду добавляют антиоксиданты, такие, как восстановленный глутатион, β -меркаптоэтанол или дитиотрейтол. Можно также проводить разрушение клеток и все последующие процедуры в анаэробной камере. Анаэробная камера дорого стоит, и работа в ней связана с определенными неудобствами, однако в некоторых лабораториях для предотвращения инактивации ферментов успешно применяют именно этот способ. Чтобы уменьшить инактивацию, вызываемую двухвалентными ионами, часто в клеточные экстракты добавляют хелатообразующие агенты, например ЭДТА. Поскольку многие ферменты *in vitro* чувствительны к инактивации теплом, экстракты клеток обычно готовят и хранят при температуре 0—4°C. Однако некоторые ферменты инактивируются при низкой температуре и при 0—4°C быстро теряют активность.

Если не удастся обнаружить активность фермента, который, по-видимому, присутствует в неочищенном экстракте, это может объясняться рядом причин. Во-первых, предположение о присутствии фермента может быть ошибочным. Во-вторых, фермент может присутствовать в экстракте, но не проявлять активность, пока в реакционную смесь не будут внесены недостающие компоненты или из нее не будут удалены ингибиторы его активности. Причины такого рода уже обсуждались выше, а некоторые другие факторы рассматриваются в большинстве работ, указанных в списке литературы по этой теме.

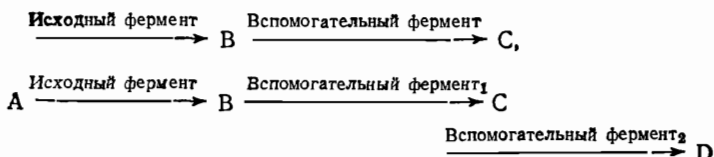
Помимо всего прочего, рекомендуется проводить контрольный эксперимент, добавляя к исследуемой смеси экстракт клеток, заведомо содержащий интересный фермент [50]. Если в условиях проводимого эксперимента контрольный фермент проявляет активность, можно с уверенностью (хотя и неполной) считать, что экстракт содержит все необходимые компоненты и не содержит ингибиторов. Но даже после проведения такого контроля и выявления активности добавленного фермента полной уверенности в отсутствии исходной активности нет. Ее отсутствие может быть обусловлено множеством непредсказуемых факторов. Например, не исключено, что фермент присутствует в экстракте в неактивной форме. Известно также о существовании реакций, в результате которых фермент становится неактивным из-за ковалентных изменений в его белковой части (разд. 18.3.4).

Конкурентные побочные реакции и сопряженный анализ

Определению ферментативной активности могут мешать конкурентные побочные реакции. Концентрации субстратов или образующихся веществ могут настолько сильно меняться в результате таких конкурентных реакций, что точное измерение активности становится невозможным.

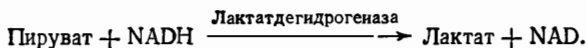
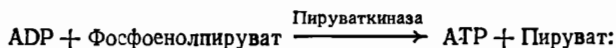
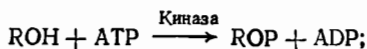
Например, активность NADH-оксидазы или аденозинтрифосфатазы в неочищенных экстрактах может быть такой высокой, что определение образования или потребления NADH или АТФ соответственно будет вызывать большие трудности. Необходимо либо учитывать побочные реакции путем соответствующего контроля, либо находить способы их подавления или нарушения.

Вместе с тем конкурентные реакции используются при разработке методик сопряженного анализа. Такие методики предусматривают взаимодействие исходного фермента (активность которого измеряют) с одним или двумя вспомогательными ферментами, внесенными в реакционную смесь:



Применение сопряженного анализа, а также некоторые способы регулирования конкурентных побочных реакций можно проиллюстрировать на примере описанной Вудом [50] методики общего определения киназ. Она применима также ко многим другим субстратам, включая глюконовую и 2-кетоглюконовую кислоты, пентозы и полиолы, а также гексозы.

Методика основана на взаимодействии ADP, образованного в результате реакции, катализируемой АТР-киназой (исходного фермента), с пируваткиназой и лактатдегидрогеназой (два вспомогательных фермента):



Как было установлено, скорость реакции, катализируемой исходным ферментом, является фактором, ограничивающим скорость общей реакции; ее определяют путем непрерывного измерения изменяющейся со временем оптической плотности при 340 нм и выражают в микромолях в 1 мин, зная коэффициент экстинкции ($6,22 \cdot 10^6 \text{ см}^2/\text{моль}$) и объем реакционной смеси. Затем вычисляют удельную активность в микромолях субстрата, фосфорилируемого в 1 мин, на 1 мг белка.

Применение повторного синтеза АТР в этой системе дает явное преимущество, заключающееся в возможности использования малых количеств АТР, что позволяет снизить участие АТР в побочных реакциях и одновременно уменьшить возможное ингибирование киназы аденозинтрифосфатом. Концентрация АТР остается почти

постоянной. Применяя регистрирующий спектрофотометр, получают более надежные данные, чем в случае однократного определения активности в каждой точке.

Для анализа готовят следующие реактивы: 0,7 М трис·HCl, pH 7,5; 0,1 М MgCl₂; 0,05 М Na₂-АТР; 0,05 М тринатрий- или трициклогексиламмонийфосфоенолпируват; 0,15 М глутатион натрия (восстановленный); 0,005 М Na₂-NADH; 0,15 М лактатдегидрогеназа; 0,15 М пируваткиназа и 0,15 М субстрат. В микрокувету (1,25×1,25×2,5 см, объем 0,5 мл; Pyrocell Manufacturing Co., Westwood, N. J.) вносят с помощью микропипетки или шприца для газового хроматографа 0,05 мл трис-буфера, по 0,01 мл MgCl₂, АТР, фосфоенолпирувата, глутатиона и NADH, 0,5 мкл лактатдегидрогеназы, а также воду, киназную фракцию и субстрат до конечного объема 0,15 мл. При таком объеме реакционной смеси пучок света должен быть очень узким. Для ежедневного определения большого количества проб реактивы объединяют, чтобы снизить число необходимых добавок. Реакцию начинают добавлением субстрата. Каждый опыт должен иметь контроль на: 1) суммарную скорость реакций, катализируемых NADH-оксидазой и аденозинтрифосфатазой, путем проведения реакций в отсутствие субстратов и 2) восстановление NADH-связанного субстрата (если это возможно) путем проведения реакции в отсутствие АТР.

Удобным вариантом этой методики является сильное снижение скорости окисления NADH путем замены NADH на NADPH. Лактатдегидрогеназа реагирует с NADPH со скоростью, составляющей примерно 10% скорости реакции с NADH. Поскольку NADPH-оксидазная активность в бактериальных экстрактах обычно очень низка, единственное, что нужно для устранения излишне высокой скорости окисления NADH, — это компенсаторное увеличение (приблизительно в 100 раз) содержания лактатдегидрогеназы. При сопряженном анализе с использованием лишь одного вспомогательного фермента обычно достаточно его добавления в постепенно увеличивающихся количествах до тех пор, пока не будет возможным точное определение линейной начальной скорости основной реакции. Методика определения времени, необходимого для достижения линейной

скорости реакции, и количества каждого вспомогательного фермента, добавляемого в реакционную смесь, разработана и описана Мак-Клуром [29].

Общие замечания

Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендует во всех случаях считать единицей ферментативной активности количество микромолей субстрата, потребляемого в 1 мин (или продукта, образующегося в 1 мин). На практике, однако, активность ферментов часто выражают в других единицах, взятых из оригинальных статей, опубликованных в различных журналах. Поэтому и в описанных ниже методиках приводятся различные единицы активности (в том виде, в котором они даются авторами). Однако, где это возможно, следует использовать активность ферментов в международных единицах.

Необходимо еще раз предупредить читателя о том, что собранные здесь методики определения активности ферментов нельзя считать догмой. Каждая методика была разработана (в большинстве случаев) для определения конкретного фермента в данной бактерии (в частности, *E. coli*), поэтому не будет излишним подчеркнуть, что условия, необходимые для получения максимальной активности фермента у бактерии одного вида, не обязательно окажутся оптимальными для того же фермента у бактерии другого вида. Применение методик без учета конкретных особенностей бактерий может привести к ошибочным выводам.

18.2.2. Общие меры по стандартизации

При определении удельной активности фермента в клетках необходимо учитывать ряд факторов. Прежде всего, следует использовать насыщающие концентрации субстратов. В этом случае возможно определение количества единиц ферментативной активности, присутствующих в данном препарате, при условии линейной зависимости активности как от времени реакции, так и от количества присутствующего фермента. Выполнение этого условия проверяют эмпирически для каждого слу-

чая. В описываемых ниже экспериментах наглядно демонстрируется, какие именно способы применяют обычно для этой цели, а также каковы различия между ферментативной и удельной ферментативной активностью. Для опытного сотрудника эта разница очевидна, но для начинающего студента она может стать источником значительных затруднений.

В приведенных ниже примерах с β -галактозидазой в качестве источника ферментов использовали обработанные толуолом клетки *E. coli*. Методика определения удельной активности фермента и обработка клеток толуолом описаны в разд. 18.2.8.

*Стандартизация определения β -галактозидазы у *E. coli**

Используют любой дикий штамм *E. coli* и выращивают две культуры по 100 мл (А и Б) при сильном встряхивании в течение ночи (37 °C). В обеих культурах индуцируют синтез β -галактозидазы внесением в культуральную среду 2,5 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозид в качестве индуктора. Синтез фермента культурой Б снижается при добавлении в среду 20 мМ глюкозы. Удобно пользоваться основной средой, содержащей в 1 л: 2 г KH_2PO_4 , 7 г K_2HPO_4 , 1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 2,5 г безвитаминного гидролизата казеина. Доводят pH среды до 7,2. В этих условиях синтез β -галактозидазы почти не подавляется. Культура А дает более чем достаточно клеток для последующих опытов. Клетки культуры Б в результате катаболитной репрессии глюкозой содержат значительно меньше β -галактозидазы, чем клетки культуры А.

Количество биомассы используемых клеток удобно определять по калибровочной кривой, отражающей зависимость между оптической плотностью при 420 нм (определяемой с помощью колориметра) суспензии клеток в 0,05 М натрий-фосфатном буфере. pH 7,2, и сухим весом бактерий. Культуры должны быть разбавлены соответствующим образом, так чтобы зависимость между оптической плотностью и сухим весом была линейной (разд. 25.2.2). В описываемых ниже экспериментах в качестве относительной меры при измерении био-

массы можно использовать единицы оптической плотности при условии, что измерения проводятся при таких концентрациях клеток, когда зависимость между оптической плотностью и количеством биомассы имеет линейный характер.

Клетки в культурах А и Б собирают центрифугированием, промывают один раз 0,05 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,2, и ресуспендируют в том же буфере. Отбирают пробы и соответствующим образом разводят их, чтобы определить количество биомассы (например, по оптической плотности при 420 нм или в микрограммах сухих клеток в 1 мл) в единице объема. Затем клетки обрабатывают толуолом, как описано ниже (разд. 18.2.8), после чего их можно использовать в последующих процедурах по стандартизации.

Зависимость активности фермента от времени

Готовят 10—20 проб реакционной смеси, содержащих достаточное количество клеток (обычно его определяют в предварительных опытах с различными концентрациями клеток). Реакцию начинают добавлением о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды, а останавливают с помощью Na_2CO_3 , который вносят через 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. Снимают показания оптической плотности при A_{420} и определяют время, в течение которого скорость реакции остается линейной. Выбирают удобное для эксперимента время (например, 15 мин) в пределах линейного участка кривой и пользуются им в последующих экспериментах.

Зависимость активности фермента от количества биомассы

Готовят еще одну серию разведений реакционной смеси, содержание клеток в которых увеличивается от нуля до относительно высокого уровня. При повышенном содержании клеток дополнительную мутность суспензии при 420 нм следует учитывать путем сравнения с контрольными пробами. Контрольные пробы по составу идентичны опытным, но в них отсутствует о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид. Значения A_{420} контроль-

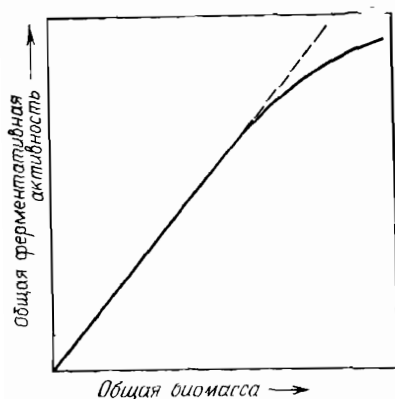


Рис. 18.1. График зависимости ферментативной активности от количества биомассы.

ных проб вычитают из соответствующих значений опытных проб. Все реакции заканчивают в заранее определенное время (например, через 15 мин). Затем вычисляют активность фермента и откладывают ее значения в виде функции количества биомассы в реакционной смеси, как показано на рис. 18.1. Результаты, полученные при работе с данным ферментом, можно считать достоверными при условии, что анализ проводился в пределах линейного участка рассмотренной выше кривой.

Эти же процедуры по стандартизации следует провести с клетками культуры Б. После расчета ферментативной активности, приходящейся на единицу биомассы (1 мг или 1 мкг сухого веса или одна единица оптической плотности при 420 нм), и сравнения полученных результатов с результатами для клеток культуры А определяют удельную активность фермента, присутствующего в каждой культуре. Клетки культуры Б, подвергавшиеся катаболитной репрессии, имеют более низкую по сравнению с клетками культуры А активность β -галактозидазы на единицу биомассы.

18.2.3. Общие методики

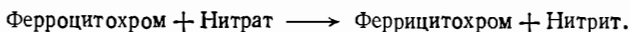
Мы не можем описать здесь подробно все многочисленные способы определения различных ферментов. Достаточно сказать, что анализ может быть непрерывным, когда за реакцией наблюдают, не нарушая ее хода, или периодическим, т. е. связанным с периодическим отбором проб для измерения потребления субстрата или образования продукта. Например, фумаразу можно определять с помощью непрерывного анализа, применяя пря-

мое спектрофотометрическое измерение или метод сопряжения с другой ферментативной системой (анализ глутаминсинтетазы последним методом см. в разд. 18.2.11). Предпочтительнее, однако, применять метод с периодическим отбором проб. Его осуществляют с помощью самых разнообразных способов, включая спектрофотометрический, манометрический, полярометрический и хроматографический. Проводят измерения также с помощью электродов и с использованием широкого набора химических агентов и изотопов (гл. 16).

С некоторыми из этих способов можно познакомиться на примере восьми описанных ниже методик, в которых определяют активность ферментов каждого из шести классов: оксидоредуктаз, трансфераз, гидролаз, лиаз, изомераз и лигаз. Ферменты каждого класса участвуют в регуляторных процессах метаболизма. Методы изучения регуляции ферментативной активности и синтеза ферментов рассматриваются ниже в этой же главе. Все ферменты, активность которых определяют в приведенных здесь методиках, встречаются в клетках широко распространенных диких штаммов *E. coli*, например в клетках штамма Крукса (ATCC 8739), штамма W (ATCC 9637) или штамма K-12 (ATCC 14948).

18.2.4. Оксидоредуктазы (нитратредуктаза)

Нитратредуктаза (цитохром) (КФ 1.9.6.1, ферроцитохром: нитрат оксидоредуктаза) катализирует следующую окислительно-восстановительную реакцию:

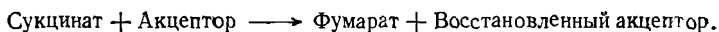


Такая нитратредуктаза является связанным с мембраной ферментом дыхательной цепи, ассоциированным с формиадегидрогеназой и цитохромом *b*. Индукция его синтеза происходит в условиях анаэробного роста, при которых NO_3^- может служить акцептором электронов при анаэробном дыхании. Ферментативную активность разрушенных клеток определяют при наличии соответствующего восстановителя (например, метилвиологена). Ниже приведена методика, разработанная Лоу и Эвансом [27], краткое описание которой содержится в *Worthington Enzyme Manual* [9].

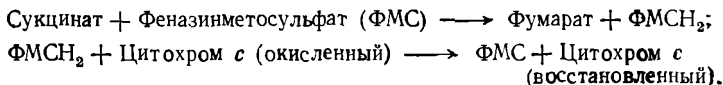
Для приготовления контрольной пробы берут равные объемы (0,1 мл) 0,15 М фосфата калия, рН 7,0, 0,02%-ного метилвиологена и свежеприготовленного на дистиллированной воде (перегнанной с помощью стеклянного дистиллятора) раствора, содержащего 23 мМ дитионит натрия и 48 мМ бикарбонат натрия. При температуре 30 °С к контрольной пробе и опытной пробе (содержащей вместо воды 0,1 мл 0,10 М нитрата натрия) добавляют фермент. Реакцию останавливают усиленной аэрацией (до полного исчезновения синей окраски). Количество образовавшегося нитрита определяют колориметрически следующим образом. К 0,4 мл анализируемой смеси быстро добавляют 0,5 мл 58 мМ сульфаниламида (приготовленного в 3 н. НСl) и 0,5 мл 0,39 мМ N-(1-нафтил)этилендиамингидрохлорида. Добавляют 1,5 мл воды и инкубируют при комнатной температуре 10 мин. Измеряют оптическую плотность при 540 нм, используя в качестве слепой контрольную пробу. Количество микромолей образовавшегося NO_2^- находят по ранее построенной калибровочной кривой.

18.2.5. Оксидоредуктазы (сукцинатдегидрогеназа)

Сукцинатдегидрогеназа [КФ 1.3.99.1, сукцинат: (акцептор) оксидоредуктаза] катализирует окисление сукцината через ряд акцепторов электронов с помощью следующей окислительно-восстановительной реакции:



Сукцинатдегидрогеназа — это связанный с мембраной флавопротеиновый компонент цикла трикарбоновых кислот. Он функционирует только в аэробных условиях, а его синтез частично находится под контролем сАМР, по крайней мере у *E. coli*. Активность фермента в разрушенных клетках или очищенных мембранных препаратах определяют с помощью непрерывного спектрофотометрического анализа (1), включающего восстановление цитохрома с:

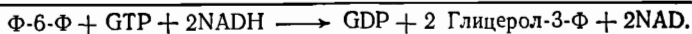
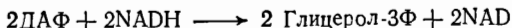
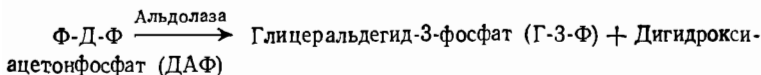
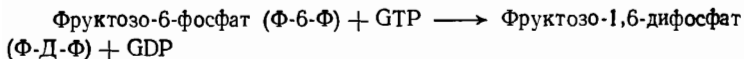


Скорость восстановления цитохрома измеряют с помощью однолучевого спектрофотометра при 550 нм. Кривая оптической плотности регистрируется на ленточном самописце.

Реакционная смесь состоит из 50 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 7,6, 2,5 мл 1 М сукцината, 10 мл 0,01 М ЭДТА, рН 7,6, 0,75 мл KCN (5,8 мг/мл) и 42,5 мл дистиллированной воды. 2,5 мл этой смеси вносят в пробирку, содержащую от 5 до 100 мкл фермента, и инкубируют 15 мин при 23 °С. 1,95 мл этого раствора переносят в кювету, добавляют 15 мкл цитохрома *c* (тип III Sigma, из сердца лошади, 250 мг/2,4 мл) и перемешивают. Спектрофотометр устанавливают на нуль, регулируя ширину щели. Реакцию начинают добавлением 25 мкл феназинметосульфата (ФМС; водный свежеприготовленный раствор с концентрацией 12 мг/мл, который хранят в темной склянке). Эксперимент проводят в затемненной комнате. Скорость реакции находят по наклону кривой оптической плотности, записываемой самописцем (изменение оптической плотности $[\Delta A]$ в 1 мин). Единицу активности сукцинатдегидрогеназы выражают в микромолях цитохрома *c*, восстанавливаемого в 1 мин ($\Delta A \div \text{коэффициент экстинкции } \varepsilon_{550} = 29,9$) в этих условиях. Вместо цитохрома *c* в подобном эксперименте можно использовать 2,6-дихлорфенолиндифенол.

18.2.6. Трансферазы (фосфофруктокиназа)

Фосфофруктокиназу (КФ 2.7.1.11, АТР:D-фруктозо-6-фосфат 1-фосфотрансферазу) можно определять по следующей методике, разработанной для дрожжевой фосфофруктокиназы [43]. Непрерывно спектрофотометрируют реакционную смесь, в которой протекают следующие трансферазные реакции:



GTP используют вместо АТР, вызывающего аллостерическое ингибирование. В состав реакционной смеси входят (указаны конечные концентрации): 1 мМ Ф-6-Ф, 1 мМ GTP, 5 мМ $MgCl_2$, 25 мМ фосфат калия, рН 6,5, 5 мМ этантиол, 0,15 мМ NADH, 0,1 ед./мл альдолазы, 1 ед. (в 2 мл) глицеролфосфатдегидрогеназы, 1,5 ед./мл триозофосфатизомеразы. За окислением внесенного NADH наблюдают в кювете (с длиной оптического пути 1 см), содержащей 2,0 мл смеси. Реакцию начинают добавлением фосфофруктокиназы (не более 10^{-2} ед. фермента) и наблюдают за ней по снижению оптической плотности при 340 нм. В каждом эксперименте, особенно с неочищенными препаратами, готовят контрольную пробу без GTP для определения активности NADH-оксидазы. Значение оптической плотности в контрольной пробе вычитают из соответствующего значения опытной пробы.

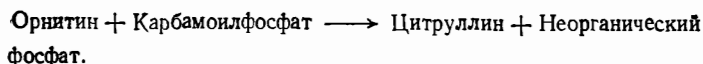
При количественном анализе аллостерической регуляции с помощью АТР, ADP и AMP в неочищенных экстрактах, содержащих глюкозофосфатизомеразу, важно не допускать значительных изменений концентрации Ф-6-Ф в результате изомеризации. Для этого можно добавить 0,2 М нейтрализованный раствор глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) и 20 ед. Г-6-Ф-изомеразы на 1 мл. В течение 1 ч при комнатной температуре в растворе будут находиться 0,05 М Ф-6-Ф и 0,15 М Г-6-Ф. За международную единицу принято количество фермента, которое фосфорилирует 1 мкмоль Ф-6-Ф в 1 мин в описанных выше условиях при 25 °С [$\Delta A_{340} \div 2 \div 6,22 \cdot 10^3 =$ (микромоли в 1 мл) $\cdot 2 =$ микромоли на кювету].

АТР является субстратом и аллостерическим ингибитором фосфофруктокиназы, и его действие зависит от концентрации Ф-6-Ф. AMP снимает ингибирующее действие АТР. Цитрат также является ингибитором, особенно в присутствии АТР, а NH_4 , напротив, активизирует фермент.

18.2.7. Трансферазы (орнитин — карбамоилтрансфераза)

Орнитин — карбамоилтрансфераза (КФ 2.1.3.3, карбамоилфосфат: L-орнитин карбамоилтрансфераза) катализирует шестую стадию синтеза L-аргинина у *E. coli*

и репрессируется конечным продуктом этого синтеза. Фермент осуществляет следующую трансферазную реакцию:

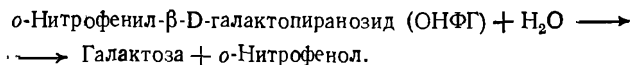


За реакцией следят по появлению производных форм продукта, как описано Нейхардтом и Бойдом [31]. Как и в случае с β -галактозидазой, в качестве источника фермента используют клетки *E. coli*, обработанные толуолом, или неочищенные экстракты *E. coli*.

К 2 мл обработанных толуолом клеток, разведенных в нужной концентрации, добавляют 0,3 мл 62 мМ карбамоилфосфата и 0,3 мл 50 мМ MgCl_2 . Реакцию запускают добавлением 0,3 мл 0,1 М L-орнитина. Инкубируют 20 мин при 37°C, затем останавливают реакцию охлаждением во льду и добавлением 2,0 мл 0,25 н. HCl . Смесь хорошо перемешивают и центрифугируют для удаления клеток. Надосадочную фракцию сливают в пробирки. Для определения образовавшегося цитруллина отбирают необходимое количество надосадочной фракции (от 0 до 2,0 мл) и обрабатывают следующим образом. Разводят пробы до 2,0 мл дистиллированной водой (контрольная проба содержит только воду) и добавляют специальной пипеткой 1,0 мл смеси серной и фосфорной кислот (1:3) и 0,13 мл 3%-ного 2,3-бутадионмоноксима. Хорошо перемешивают, закрывают пробирки стеклянными шариками и нагревают в бане с кипящей водой в течение 10 мин. Затем пробы охлаждают 10 мин в закрытой от света холодной водяной бане (свет вызывает побочную реакцию). Измеряют оптическую плотность при 490 нм и находят количество молей образовавшегося цитруллина по калибровочной кривой, полученной для L-цитруллина в диапазоне от 0 до 0,25 мкмоль. За единицу активности фермента принимают такое его количество, при добавлении которого образуется 1 мкмоль цитруллина в 1 мин в указанных условиях.

18.2.8. Гидролазы (β -галактозидаза)

β -Галактозидаза (КФ 3.2.1.23, β -D-галактозид — галактогидролаза) катализирует следующую гидролазную реакцию:



Вместо лактозы — естественного субстрата для этого бактериального фермента — можно использовать искусственный субстрат о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ОНФГ), который не окрашен, но при гидролизе образует о-нитрофенол, имеющий в щелочном растворе желтый цвет. Реакция протекает в присутствии бесклеточного экстракта или клеток, обработанных толуолом; для стимуляции в смесь добавляют ионы Na^+ или тиоловые реагенты. Ниже описывается модифицированная методика Парди и др. [34].

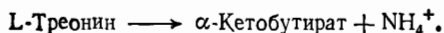
Готовят реакционную смесь, содержащую 4,1 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,5, и 0,2 мл 0,032 М восстановленного глутатиона. Смесь выдерживают до установления температуры 30 °С. Добавляют фермент в объеме 0,2 мл и начинают реакцию внесением 0,50 мл 0,01 М ОНФГ (предварительно инкубированного). По окончании инкубации (обычно в течение 15 мин, но вообще это время зависит от количества фермента в клетках) реакцию останавливают. Окраска смеси усиливается, если добавить 1 мл 1 М Na_2CO_3 . Смесь встряхивают и измеряют оптическую плотность при 420 нм. За единицу ферментативной активности принимают количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль о-нитрофенола в 1 ч в условиях эксперимента. Строят калибровочную кривую, отражающую зависимость между оптической плотностью при 420 нм и концентрацией о-нитрофенола в условиях проведения эксперимента.

Клетки, обработанные толуолом, готовят следующим образом. Пробы культуры по 1,0, 0,5 или 0,20 мл добавляют к 4,0, 4,5 или 4,8 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, рН 7,5, для получения разведений 1:5, 1:10 или 1:25 соответственно. Измерив оптическую плотность этих разведений, по калибровочной кривой можно оп-

ределить массу (сухой вес) клеток, содержащихся в каждой пробе. Разведения культур можно хранить до анализа на β -галактозидазу в течение 6 ч во льду. Перед самым экспериментом их вынимают из ледяной бани и обрабатывают одной каплей толуола и одной каплей 0,1%-ного дезоксихолата натрия. Закрывают пробирки пробками, встряхивают 15 мин при 37°C и вновь ставят в ледяную баню. Для определения β -галактозидазной активности (см. выше) из каждой пробы отбирают по 0,2 мл.

18.2.9. Лиазы (треониндегидратаза)

Треониндегидратаза [КФ 4.2.1.16, L-треонин-гидро-лиаза (дезаминирующая)] катализирует следующую реакцию:



У многих бактерий имеются два таких фермента, один из них катализирует деградацию треонина, а другой — синтез. Деградирующий фермент отличается от синтезирующего индуцибельностью, т. е. он способен синтезироваться в отсутствие глюкозы и кислорода в среде, содержащей L-треонин и некоторые другие аминокислоты с разветвленными цепями, однако лучше всего он синтезируется в среде, содержащей более сложную аминокислотную смесь. Деградирующий фермент активируется в присутствии АМР. Синтезирующий фермент репрессируется конечным продуктом; его активность подавляется также L-изолейцином. Активность обоих ферментов измеряют по образованию производного α -кетобутирата — 2,4-динитрофенилгидразона. Деградирующий фермент исследуют в клеточных экстрактах или в клетках, обработанных толуолом, по следующей методике [20].

В состав реакционной смеси (конечный объем 1 мл) входят 0,20 мл 0,5 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,10 мл 0,1 М АМР (нейтрализованного) и 0,20 мл 0,5 М L-треонина. Реакцию начинают при 37°C добавлением препарата фермента и останавливают внесением 1 мл 1 н. НСl. Затем добавляют 0,2 мл 0,1%-ного 2,4-динитрофенилгидразина и смесь вновь инкубируют при 37°C. Приблизительно через 10 мин добавляют 2 мл 2 н.

NaOH и в колориметре измеряют оптическую плотность гидразона при 416 нм. Строят калибровочную кривую, отражающую зависимость между оптической плотностью и концентрацией натриевой соли α -кетобутирата в условиях эксперимента. За единицу фермента принимают такое его количество, которое катализирует образование 1 мкмоль α -кетобутирата в 1 мин в указанных условиях.

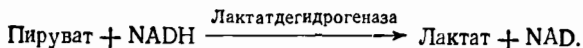
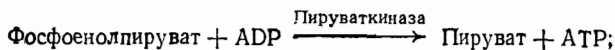
Синтезирующий фермент определяют по методике с использованием лизированных клеток или клеточного экстракта [18]. Ниже приведено описание методики с экстрактами. Реакционная смесь (конечный объем 1,0 мл) состоит из 0,10 мл 1 М трис·HCl, pH 8,0, 0,10 мл 1 М NH_4Cl , 0,1 мл 1 мМ пиридоксальфосфата, 0,20 мл 0,2 М L-треонина и 0,10 мл экстракта. Объем смеси до 1,0 мл доводят водой. Для каждой серии анализов готовят контрольную пробу без L-треонина. Пробирки инкубируют при 37°C в течение заранее определенного времени (около 10—20 мин). Останавливают реакцию добавлением 0,10 мл 50%-ной ТХУ и определяют образование α -кетобутирата, как описано выше.

18.2.10. Изомеразы (L-арабинозоизомераза)

L-Арабинозоизомераза (КФ 5.3.1.4, L-арабиноза кетол-изомераза) катализирует следующую изомеразную реакцию:



Этот фермент можно определять в непрерывной системе [48], описанной выше для анализа киназы, в сочетании со следующими сопряженными реакциями:



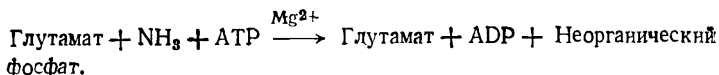
L-Арабинозоизомеразу можно также исследовать с помощью простого спектрофотометрического метода, основанного на определении образовавшейся кетопентозы с помощью реакции Дише и Боренфройнда на цистеин-

карбазол с использованием L-арабинозы в качестве субстрата [41]. Эту реакцию можно проводить с неочищенными клеточными экстрактами или с клетками, обработанными толуолом, так же как в случае с β -галактозидазой.

Реакционная смесь (1,0 мл) состоит из 10 мкмоль L-арабинозы, 43 мкмоль трис-буфера, pH 7,5, и препарата фермента в нужном разведении (экстракт или клетки, обработанные толуолом). Для каждой серии анализов готовят контрольные смеси без фермента. После 10 мин инкубации при комнатной температуре (или 30 °C) добавляют 0,20 мл 1,5%-ного раствора цистеин-гидрохлорида и 6 мл смеси, приготовленной из 190 мл воды и 450 мл конц. H_2SO_4 . Сразу же после этого добавляют 0,2 мл 0,12%-ного спиртового раствора карбазола. Смесь встряхивают и оставляют на 20 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность при 540 нм в колориметре или спектрофотометре. За единицу активности принимают количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль L-рибулозы в 1 мин в указанных условиях. Для построения калибровочной кривой (в пределах 0—0,25 мкмоль), отражающей зависимость между оптической плотностью при 540 нм и концентрацией L-рибулозы в данных условиях, используют имеющийся в продаже L-рибулозо-о-нитрофенилгидразон.

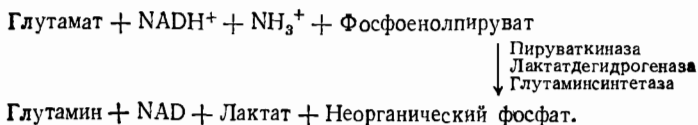
18.2.11. Лигазы (глутаминсинтетаза)

Глутаминсинтетаза [КФ 6.3.1.2, L-глутамат:аммиак лигаза (образующая ADP)] участвует в первом этапе сильно разветвленного пути, ведущего к биосинтезу многих важных конечных продуктов. У *E. coli* и *Klebsiella aerogenes* этот строго регулируемый фермент подвержен: 1) репрессии/дерепрессии, 2) сложному ингибированию по типу обратной связи и другим аллостерическим изменениям, а также 3) ковалентной модификации. Глутаминсинтетаза катализирует следующую реакцию:



Ее активность можно определять несколькими различ-

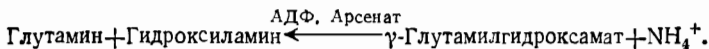
ными способами [40], в том числе с помощью описанной выше для киназ сопряженной реакции, заключающейся в окислении NADH^+ :



Хотя в реакционную смесь добавляют АТФ и в результате глутаминсинтетазной реакции образуется АДФ, в суммарном уравнении эти два вещества не фигурируют.

При такой постановке эксперимента непрерывная регистрация каталитической активности достигается благодаря сопряжению образования АДФ, катализируемого глутаминсинтетазой, и окисления NADH^+ , катализируемого пируваткиназой и лактатдегидрогеназой в присутствии фосфоенолпирувата (последние три компонента добавляют в избытке). Этот удобный, чувствительный и прямой метод, позволяющий осуществлять различные кинетические измерения, не пригоден, однако, для анализа ингибирования по типу обратной связи, так как на активность ферментов могут также влиять различные эффекторы.

При изучении регуляции (путем аденилирования/деаденилирования) глутаминсинтетазной активности с помощью ковалентной модификации очень удобен трансферазный тест, включающий реакцию



По этой реакции определяют общее количество присутствующей глутаминсинтетазы, так как и аденилированная и деаденилированная ее формы активны. Кроме того, можно использовать целые клетки, сделав их проницаемыми для реагентов путем обработки бромидом гексадецилтриметиламмония. Определение активности глутаминсинтетазы у *E. coli* подробно описано Штадтманом и др. [45], а у *Klebsiella aerogenes* — Бендером и др. [3]. Ниже приведена методика из второго источника [3], представляющая собой вариант методики Шапира и Штадтмана [40].

Реакционную смесь готовят ежедневно из указанных

объемов основных растворов (в скобках даны конечные концентрации каждого компонента: 7,53 мл воды; 2,25 мл 1 М имидазола·HCl, pH 7,15 (135 мМ); 0,37 мл 0,80 М гидроксиламингидрохлорида (18 мМ); 0,045 мл 0,1 М $MnCl_2$ (0,27 мМ); 1,5 мл 0,28 М арсената калия, pH 7,15 (25 мМ); 0,15 мл 40 мМ Na-ADP, pH 7 (0,36 мМ); 1,5 мл бромида гексадецилтриметиламмония с концентрацией 1 мг/мл (90 мкг/мл). Если в опыте используют неочищенный экстракт клеток или очищенный фермент, последний раствор заменяют водой.

Доводят pH этой концентрированной смеси до 7,55 с помощью 2 М КОН при комнатной температуре и охлаждают до 4 °С, если опыт начинают не сразу. К 0,40 мл этой смеси добавляют фермент и доводят объем до 0,45 мл водой. Выдерживают 5 мин при 37 °С для выравнивания температуры и начинают реакцию добавлением 0,05 мл 0,2 М L-глутамин. После инкубации в течение необходимого времени реакцию останавливают добавлением 1 мл «стоп-смеси». В состав этой смеси входит $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (55 г), ТХУ (20 г), конц. HCl (21 мл) и вода (до 1 л). Пробы центрифугируют для удаления осадка и измеряют оптическую плотность при 540 нм. В этих условиях 1 мкмоль глутамилгидроксамата при 540 нм имеет оптическую плотность 0,532. За единицу активности принимают количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль глутамилгидроксамата в 1 мин, а удельную активность находят, поделив активность фермента на количество клеточного белка в миллиграммах. Для каждой серии опытов готовят контрольные пробы, содержащие вместо растворов арсената и ADP воду. Это позволяет сделать поправку на γ -глутамилгидроксамат, образующийся благодаря возможному присутствию любой глутаминазы. При таком определении и аденилированная и неаденилированная формы фермента активны. Для определения активности только неаденилированного фермента к реакционной смеси добавляют 60 мМ $MgCl_2$ при pH 7,15.

Штадтман и сотр. [40, 45] вычислили значение $\tilde{n}$ (состояние аденилирования) для этого фермента у *E. coli* в условиях, сходных с описанными выше:

$$\tilde{n} = 12 - 12 \frac{\text{Активность в } 0,4 \text{ М } MnCl_2 + 60 \text{ мМ } MgCl_2, \text{ pH } 7,2}{\text{Активность в } 0,4 \text{ М } MnCl_2, \text{ pH } 7,38}$$

18.3. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ

18.3.1. Общие замечания

После точного, чувствительного и стандартизированного определения активности фермента можно переходить к выяснению вопроса о том, подвергается ли фермент одному или нескольким процессам регуляции метаболизма. Показано, что у бактерий существуют два основных типа регуляции ферментативной активности — аллостерический и ковалентная модификация.

Виды аллостерической регуляции ферментативной активности:

- Простое ингибирование конечным продуктом
- Кумулятивное ингибирование конечным продуктом
- Последовательное ингибирование конечным продуктом
- Стимуляция предшественником
- Ингибирование предшественником
- Стимуляция продуктом
- Ингибирование продуктом
- Регуляция с помощью энергетического заряда
- Катаболитное ингибирование

Виды регуляции с помощью ковалентной модификации ферментов:

- Фосфорилирование
- ADP-Рибозилирование
- Аденилирование
- Уридилирование
- Конверсия сульфгидрила

Названия видам аллостерической регуляции даны в соответствии с тем, какое положение занимает эффектор в метаболическом пути (дальнейшее обсуждение этого вопроса см. в работах [2, 16, 21, 40, 44 и 46]. При современном уровне биохимических знаний *in vivo* трудно анализировать процессы регуляции, а иногда и невозможно. Иногда возникает вопрос, действительно ли эти процессы имеют место в бактериальных клетках или они существуют лишь в воображении исследователя, но мы не будем здесь его обсуждать. К перечисленным выше видам регуляции следует относиться критически. При изучении аллостерической регуляции обычно прово-

Рис. 18.2. Влияние положительных и отрицательных эффекторов на аллостерическую регуляцию ферментативной активности.

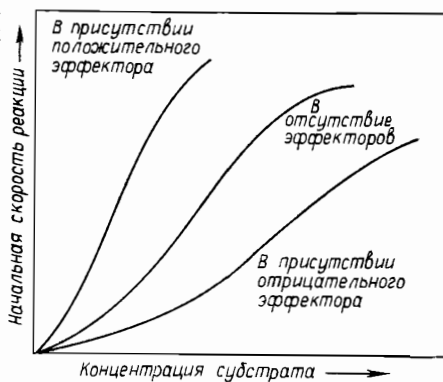
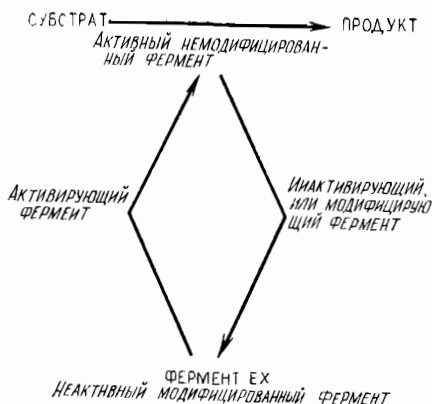


Рис. 18.3. Регуляция ферментативной активности с помощью ковалентной модификации. В простейшем виде этот процесс включает участие инактивирующего, или модифицирующего, фермента, который катализирует ковалентное ($E + X \rightarrow EX$) изменение основного фермента, а также активирующего фермента, который катализирует обратный процесс ($EX \rightarrow E + X$), восстанавливая тем самым исходную ферментативную активность.



дят эксперименты *in vitro*. К реакционной смеси добавляют соединения, которые предположительно участвуют в регуляции — так называемые эффекторы, — и изучают их влияние на общий ход реакции. При аллостерических взаимодействиях влияние этих эффекторов наблюдается сразу же; оно обратимо и зависит от их концентрации.

Для аллостерических ферментов график зависимости начальной скорости реакции от концентрации суб-

страта имеет сигмоидную форму, тогда как для обычных ферментов он имеет вид гиперболы. Вероятно, это происходит потому, что субстрат, помимо собственной функции, выполняет функцию эффектора. Однако сигмоидная форма может быть обусловлена не только этим. Влияние положительных (ускоряющих) и отрицательных (ингибирующих) эффекторов на аллостерическую регуляцию иллюстрирует рис. 18.2. Подробно этот вопрос рассматривается в работах [2, 16]. По сравнению с контролем, когда эффекторы отсутствуют, для достижения необходимой скорости реакции в присутствии отрицательного аллостерического эффектора необходимы большие концентрации субстрата, а в присутствии положительных эффекторов — меньшие. Предполагают, что это обусловлено связыванием различных эффекторов со специфическими сайтами узнавания на ферменте. Такое взаимодействие приводит к конформационным изменениям в молекуле фермента, что отражается на его способности связывать субстрат и на скорости реакции.

В процессе регуляции ферментативной активности путем ковалентной модификации [21] происходит ковалентное связывание лиганда с ферментом, а не простое обратимое, как при аллостерической регуляции. Это ковалентное связывание катализируется другим ферментом, как показано на рис. 18.3. Активный (взаимно превращаемый) фермент превращается в неактивный с помощью другого фермента (инактивирующего), который ковалентно модифицирует первый. Другой фермент (активирующий) катализирует переход фермента в исходное активное состояние путем удаления появившихся ковалентных связей.

Эксперименты, иллюстрирующие оба типа регуляторных процессов (путем аллостерического и ковалентного связывания эффекторов), описаны ниже.

18.3.2. Аллостерическая регуляция (простое ингибирование конечным продуктом)

Для определения треониндегидратазы (синтезирующего фермента *E. coli*) можно использовать клеточные экстракты или лизированные клетки, как было описано

Таблица 18.1. Приготовление проб для демонстрации ингибирования треониндегидратазы L-изолейцином

Компонент	Количество, мл			
	пробирка 1	пробирка 2	пробирка 3	пробирка 4
Трис·HCl, pH 8, 1 М	0,1	0,1	0,1	0,1
NH ₄ Cl, 1 М	0,1	0,1	0,1	0,1
Пиридоксальфосфат 1 М	0,1	0,1	0,1	0,1
L-Треонин, 0,2 М	0,2	0,2	0,2	0,0
Изолейцин	0,0	0,1 ^a	0,1 ^a	0,0
Экстракт	0,1	0,1	0,1	0,1
Вода	0,4	0,3	0,3	0,6

^a Концентрация изолейцина в пробирке 2 равна 10 мМ, а в пробирке 3 — 1 мМ.

ранее. Способность L-изолейцина аллостерически ингибировать этот фермент можно продемонстрировать в следующем эксперименте (Умбэргер, личное сообщение).

Пробирки с компонентами, перечисленными в табл. 18.1, инкубируют при 37 °С до 20 мин (в зависимости от активности экстракта). Затем реакцию останавливают добавлением 0,1 мл 50%-ной (вес/объем) ТХУ. Отбирают часть реакционной смеси (опять же в зависимости от активности фермента) и разбавляют ее водой до 1,0 мл. Добавляют 3,0 мл 0,025%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 0,5 М HCl и оставляют смесь при комнатной температуре на 15 мин. Добавляют 1 мл 40%-ной КОН, встряхивают и измеряют оптическую плотность в колориметре Клетта — Саммерсона (фильтр 54) или в любом другом спектрофотометре или колориметре при 540 нм. Количество микромолей α-кетобутирата, образовавшегося в реакционной смеси, определяют по ранее полученной калибровочной кривой. При такой постановке пробы могут содержать разное количество субстрата и эффектора. Результаты откладывают в виде кривой, как показано на рис. 18.2.

18.3.3. Аллостерическая регуляция с помощью энергетического заряда

Аткинсон [2] предположил, что различные ключевые ферменты, участвующие в биоэнергетических и биосинтезирующих процессах, аллостерически регулируются в ответ на энергетический заряд клетки. Энергетический заряд равен сумме молярной фракции АТФ и половины молярной фракции АДФ (поскольку 2 моля АДФ можно преобразовать в 1 моль АТФ через аденилаткиназу), деленной на общее количество молей аденилатов:

$$\text{Энергетический заряд} = (\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ})/(\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМР}).$$

Эта гипотеза основывается на том, что аденилаты составляют общий пул взаимосвязанных конечных продуктов и поэтому могут регулировать различные ключевые реакции, регенерирующие энергию (Р-реакции) и утилизирующие ее (У-реакции), как показано на рис. 18.4. АТФ—это конечный продукт Р-реакций, а АДФ и АМР—конечные продукты У-реакций. Первый тип реакций характеризуется высоким энергетическим зарядом, а второй—низким. Считается, что регуляция таких ферментов, как фосфофруктокиназа, пируваткиназа и цитратсинтетаза происходит с участием энергетического заряда.

Для измерения ответа фермента на изменения энергетического заряда готовят реакционную смесь с постоянным суммарным содержанием аденилатов (АТФ+АДФ+АМР) при нужных значениях энергетического заряда. Величина этого пула у различных видов клеток обычно варьирует от 2 до 5 мМ. Для получения трехкомпонентной смеси с заданной величиной энергетического заряда к смеси АМР—АТФ добавляют молярную фракцию АТФ, соответствующую необходимой величине энергетического заряда, а также аденилаткиназу и инкубируют достаточно долго для установления равновесия. Используют различные концентрации Mg^{2+} и субстрата(ов). Присутствие субстрата в различных концентрациях необходимо потому, что наиболее распространенным ответом ферментов на изменение энергетического заряда является, по-видимому, изменение сродства к одному или нескольким субстратам.

Начальную скорость реакции при каждой концентрации субстрата можно отложить на графике в виде функции энергетического заряда. Совокупность таких кривых для каждой концентрации субстрата отражает влияние энергетического заряда на изучаемый фермент.

Таким способом по описанной выше методике рекомендуется определять фосфофруктокиназу. Для сравнения можно использовать другой фермент, заведомо нечувствительный к регуляции с помощью энергетического заряда. Эти эксперименты не относятся к разряду простых и быстрых экспериментов, которые можно проводить для удовлетворения любопытства. Они могут служить информативным и полезным средством приобретения опыта изучения ферментов и уточнения некоторых контрольных параметров.

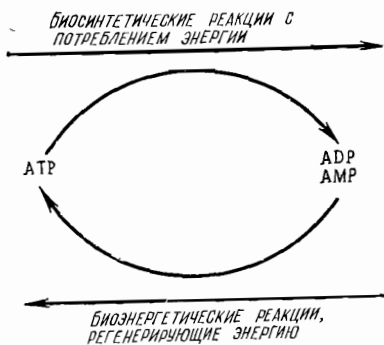


Рис. 18.4. Аллостерическая регуляция ферментативной активности с помощью энергетического заряда.

18.3.4. Регуляция с помощью ковалентной модификации (аденилирование)

Глутаминсинтетаза занимает центральное место в метаболизме азота у *E. coli* и других бактерий. Это проявляется в том, что и синтез, и каталитическая активность этого фермента контролируются множеством процессов. Его синтез регулируется с помощью репрессии/дерепрессии, а активность — рядом конечных продуктов через сложный путь различных эффекторов, а также с помощью ковалентной модификации. В этой модификации участвует сложная система активирующих и инактивирующих ферментов, а также различные эффекторы, как показано на рис. 18.5.

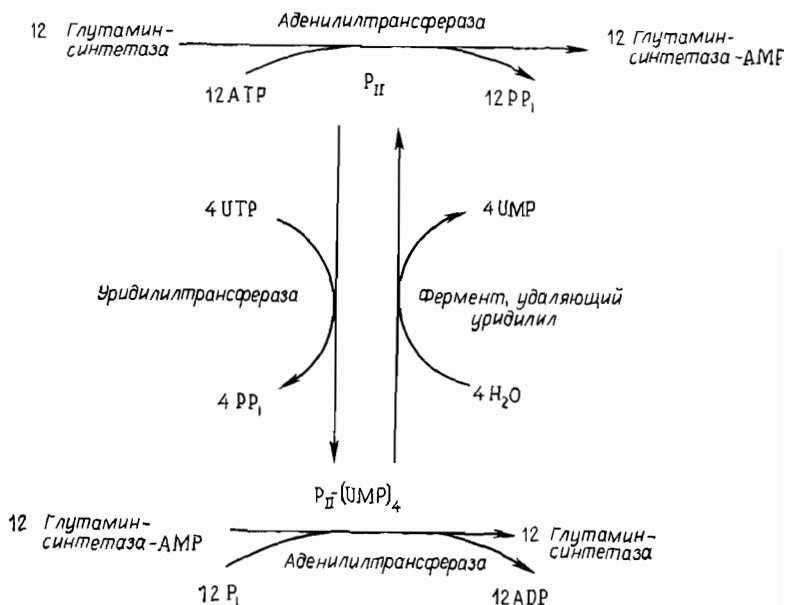


Рис. 18.5. Регуляция глутаминсинтетазы с помощью ковалентной модификации. Конвертирующий фермент (аденилилтрансфераза) с помощью 12 молекул АТФ катализирует аденилирование каждой из 12 субъединиц глутаминсинтетазы. Эта ковалентная модификация инактивирует Mg^{2+} -зависимую глутаминсинтетазу. Активность аденилилтрансферазы регулируется с помощью превращений белка P_{II} , который активирует ее. Когда белок P_{II} ковалентно модифицируется другим ферментом (уридилтрансферазой) до уридилированной формы $[P_{II}(UMP)_4]$, он активирует катализируемое аденилтрансферазой деаденилирование глутаминсинтетазы, восстанавливая тем самым ее нормальную биосинтезирующую активность [44].

Инактивацию глутаминсинтетазы путем аденилирования можно продемонстрировать *in vitro*, как это сделано в работе Меке и др. [30] или в других работах. *In vivo* это осуществили в условиях аммиачного «шока» следующим образом.

Дикий штамм *E. coli* вырастили в минеральной среде (как описано выше) с добавлением 0,4% глюкозы в качестве источника углерода и 0,2% L-глутамина в качестве источника азота до середины фазы экспоненциального роста. Отобрали пробу для анализа, а оставшуюся

юся культуру разделили на две части. Одну часть оставили необработанной, а ко второй добавили 15 мМ (конечная концентрация) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Инкубацию продолжали 5—10 мин, затем пробы отобрали для обработки бромидом гексадецилтриметиламмония и анализировали на глутаминсинтетазную активность с помощью глутамилтрансферазного теста с использованием целых клеток, как описано ранее (разд. 18.2.11). Каждую пробу (10 мл) сразу же вносили в колбу, содержащую бромид гексадецилтриметиламмония с конечной концентрацией 90 мкг/мл, встряхивали 1—3 мин при 30 °C и готовили для определения активности фермента (разд. 18.2.11). Активность фермента определяли в присутствии и в отсутствие 60 мМ MgCl_2 , как указано в методике, для того чтобы установить степень ковалентной модификации в результате аммиачного «шока». Известно, что и у *E. coli*, и у *K. aerogenes* присутствие NH_4^+ способствует аденилированию глутаминсинтетазы [3, 40, 45].

18.4. РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА

18.4.1. Общие замечания

Перефразировав изречение дельфийского оракула «Познай самого себя», можно посоветовать каждому, кому предстоит выбрать вид или штамм бактерии для изучения конкретного аспекта метаболизма: «Познай свою бактерию».

В наш век специализации стал обычным тот факт, что многие бактериологи посвящают годы, а то и всю свою научную судьбу изучению одного вида микроорганизма. Во многих случаях это оправданно. Но вместе с тем бывают ситуации, когда следует воспользоваться бесконечным разнообразием мира микробов и выбрать объект, более отвечающий целям конкретного исследования. Иногда таким объектом может оказаться малознакомый представитель микроорганизмов. Поэтому время от времени полезно изучать не только широкоизвестные, но и малоизвестные виды.

Приступая к изучению биосинтеза аминокислот, никто не станет, например, продолжать работать с молочнокислыми бактериями. Эти организмы плохо синтезируют аминокислоты, поэтому последние приходится

добавлять в их ростовую среду. По-видимому, гораздо более подходящей для этой цели является такая бактерия, как *E. coli*, которая синтезирует все свои аминокислоты из глюкозы и NH_4^+ . Однако для изучения регуляции биоэнергетических процессов у бактерии, не связанных с участием кислорода, более пригодными могут оказаться молочнокислые бактерии, а не *E. coli*. В любом случае пригодность микроорганизма для конкретного исследования определяется в основном его генетическими возможностями. Иногда можно изменить генетический потенциал в соответствии с исследовательской задачей. Это делают путем получения и отбора подходящих мутантных штаммов. Отбор таких мутантов — чрезвычайно важная процедура, ставшая одним из основных элементов методического багажа бактериолога — уже обсуждался в гл. 13 данного руководства.

Даже если генетические возможности микроорганизма позволяют ему продуцировать определенный фермент, при этом еще не гарантируется его синтез (транскрипция и трансляция). Синтез многих ферментов и ферментных систем зависит от присутствия или отсутствия определенных регуляторных компонентов, или «триггеров», образующихся эндогенно или вносимых в культуральную среду. Вещества, стимулирующие транскрипцию, называют индукторами, а сам процесс стимуляции называют индукцией. В тех случаях, когда индукторов нет, говорят о деиндукции. Другие вещества, называемые репрессорами, напротив, предотвращают транскрипцию, а сам процесс предотвращения транскрипции называют репрессией; в отсутствие репрессора происходит дерепрессия. Описаны различные типы репрессии у бактерий: простая репрессия по типу обратной связи, или репрессия конечным продуктом; мультивалентная репрессия, присущая определенным ферментам, участвующим в синтезе аминокислот с разветвленной цепью; координированная репрессия, когда все ферменты, участвующие в биосинтезе, согласованно репрессируются в присутствии высоких концентраций продукта реакции (например, триптофана или гистидина). Описанные ниже эксперименты иллюстрируют некоторые типы регуляции синтеза бактериальных ферментов путем индукции и репрессии.

18.4.2. Индукция (нитратредуктаза)

Используя соответствующий дикий штамм *E. coli* (например, ML 30 или K-12) и описанный ранее нитрат-редуктазный тест (разд. 18.2.4), можно продемонстрировать индукцию нитратредуктазы. Для этого к среде добавляют NO_3^- и выращивают культуру в анаэробных условиях. Можно также измерить накопление и последующую утилизацию NO_2^- в культуральной среде. Эти два процесса служат индикаторами регуляции активности нитрат-(или нитрит-)редуктазной системы.

Свежую культуру после одной ночи выращивания высевают в несколько колб с основной средой, содержащей (на 1 л): 2 г KH_2PO_4 , 7 г K_2HPO_4 , 1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 0,1 г $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7,2. Непосредственно перед инокуляцией добавляют в нее стерильный раствор, содержащий 0,02 М глюкозу и 0,25% (конечная концентрация) безвитаминного гидролизата казеина. Культуру выращивают при сильном встряхивании до получения приблизительно 50 мкг клеток (сухого веса) на 1 мл среды или дольше (до видимого помутнения среды) и затем обрабатывают следующим образом.

Культура А: добавляют 20 мМ NaNO_3 и поддерживают в аэробных условиях.

Культура Б: добавляют 20 мМ NaNO_3 и создают анаэробные условия, поместив культуру в плотно закрывающийся сосуд и пропуская через нее N_2 или смесь N_2 — CO_2 (95 и 5% соответственно).

Культура В: NaNO_3 не добавляют, но создают анаэробные условия, как описано выше.

Культура Г: добавляют 20 мМ NaNO_3 , поддерживают в аэробных условиях в течение нескольких часов, затем создают анаэробные условия (как для культуры Б). Если необходимо, культуру вновь переводят в аэробные условия спустя несколько часов.

Подобный эксперимент можно разработать и осуществить при изучении регуляции деградирующей триопиндегидратазы. Подобно нитратредуктазе, этот фермент синтезируется только в анаэробных условиях и репрессируется сАМР и катаболитами.

В обоих случаях отбирают пробы культуры (если мутность настолько высока, что мешает последующему

анализу, пробы центрифугируют) и определяют образование NO_2^- по следующей методике. Пробы из каждой культуры (0,2 мл) добавляют к 1 мл реактива А, содержащего 0,80% сульфаниловой кислоты в 5 н. уксусной кислоте. Пробы разбавляют до 10 мл 0,05 М фосфатным буфером, рН 7,5, затем добавляют 1,0 мл реактива Б (6 мл диметил- α -нафтиламина в 1 л 5 н. уксусной кислоты). Оставляют на 30 мин для развития окраски, измеряют оптическую плотность при 540 нм и вычисляют концентрацию NO_2^- в каждой пробе по ранее полученной калибровочной кривой.

Можно также отбирать пробы культур и после центрифугирования измерять активность нитратредуктазы в клетках, как описано выше (разд. 18.2.4). Этот фермент синтезируется только в анаэробных условиях и требует в качестве индуктора NO_3^- (удаление NO_3^- приводит к деиндукции).

18.4.3. Репрессия конечным продуктом реакции (орнитин — карбамоилтрансфераза)

Этот важный регуляторный процесс легко демонстрируется на большинстве штаммов *E. coli* при сравнении культур, выращенных на основной среде, содержащей глюкозу и минеральные соли, в присутствии L-аргинина и без него [31]. Орнитин — карбамоилтрансфераза катализирует шестую, заключительную, стадию синтеза конечного продукта — L-аргинина. В присутствии L-аргинина синтез фермента репрессируется. Это можно показать при выращивании дикого штамма в течение ночи в любой подходящей солевой среде (например, как описано в других разделах этой главы), содержащей для культуры 1 : 0,02 М раствор глюкозы; для культуры 2 : 0,02 М раствор глюкозы и L-аргинин (100 мкг/мл); для культуры 3 : 0,02 М раствор глюкозы и другую аминокислоту, например гистидин (100 мкг/мл).

Клетки собирают, промывают 0,1 М трис·HCl-буфером, рН 7,8, и определяют орнитин — карбамоилтрансферазу, как описано выше.

18.4.4. Мультивалентная репрессия (L-треониндегидратаза)

С помощью подобной же серии опытов можно продемонстрировать чувствительность L-треониндегидратазы (синтезирующего фермента) к мультивалентной репрессии конечным продуктом реакции (L-изолейцином, I-лейцином, L-валином). Для такой репрессии требуется присутствие всех трех аминокислот (Умбэргер, личное сообщение).

Культура 1: 200 мл минимальной среды и 0,02 М глюкоза.

Культура 2: 200 мл минимальной среды, 0,02 М глюкоза, 0,8 мМ L-валин, 0,4 мМ L-лейцин и 0,4 мМ L-изолейцин.

Культура 3: 200 мл минимальной среды, 0,02 М глюкоза, 0,8 мМ L-валин, 0,4 мМ L-лейцин и 0,15 мМ L-изолейцин.

С помощью описанного выше теста на треониндегидратазу измеряют удельную активность фермента в клетках, выращенных в течение ночи в трех описанных выше средах. В культуре 2 должна выявляться более низкая ферментативная активность, чем в культуре 1. Культура 3 будет подвергаться дерепрессии относительно культуры 2 из-за постепенного снижения внутриклеточной концентрации L-изолейцина (содержание L-изолейцина в культуре 3 понижено с самого начала, и, кроме того, его поглощение ингибируется двумя другими аминокислотами).

Опубликован прекрасный полный обзор общих методов, применяющихся для определения активности ферментов и путей регуляции их биосинтеза [5].

18.4.5. Индукция плюс репрессия (*lac*-оперон)

При функционировании *lac*-оперона *E. coli* происходит как репрессивная (отрицательная), так и индуктивная (положительная) генетическая регуляция (рис. 18.6). Присоединение *lac*-репрессора (продукта гена *i*) к сайту оператора предотвращает транскрипцию генов, катализируемую РНК-полимеразой (отрицательная регуляция). Индуцирующий агент (любой из β -галактозидов)

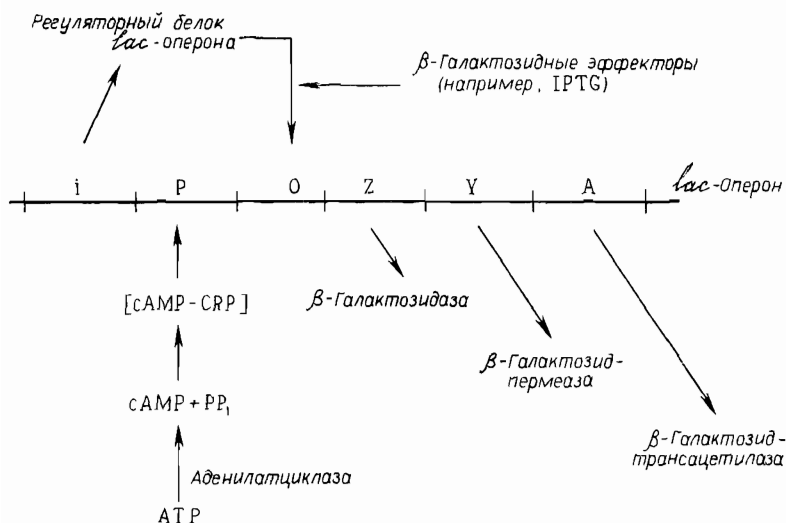


Рис. 18.6. Положительная и отрицательная регуляция *lac*-оперона у *E. coli*. Компоненты, участвующие в транскрипции *lac*-оперона, включают: гены *Z*, *Y* и *A*, кодирующие β -галактозидазу, β -галактозидпермеазу и β -галактозидтрансацилазу соответственно; регуляторный ген *i*, кодирующий образование регуляторного белка *lac*-оперона; промотор (*P*) и оператор (*O*); а также гены *сya* и *сrp*, кодирующие синтез аденилатциклазы, и белок, связывающий cAMP (CRP), соответственно. IPTG — изопропил- β -D-тиогалактопиранозид.

модифицирует белок-репрессор таким образом, что он теряет способность связываться с оператором. Однако одного этого недостаточно для инициации процесса транскрипции. Чтобы РНК-полимераза смогла осуществлять свою каталитическую функцию в транскрипции, необходимо присутствие положительного регуляторного элемента — белка — рецептора cAMP (продукта *сrp*-локуса). Такой модифицированный благодаря связыванию cAMP белок присоединяется к промотору. В результате включается *lac*-оперон и начинается транскрипция. В отсутствие индуктора (деиндукция) или при уменьшении образования cAMP из-за ингибирования аденилатциклазной активности (катаболическая репрессия) транскрипция предотвращается. Аденилатциклаза — это связан-

ный с мембраной фермент, катализирующий превращение АТР в сАМР и пирофосфат. Этот фермент обычно активен во время роста культуры в различных средах, и поэтому клетки образуют сАМР в достаточном количестве. Однако в присутствии некоторых субстратов, например глюкозы или маннита, активность фермента ингибируется и образование сАМР снижается (это явление называют катаболитной репрессией).

Основные черты этих регуляторных явлений можно продемонстрировать в серии опытов, в которых следят за синтезом β -галактозидазы, как описано выше (с использованием клеток, обработанных толуолом), при регуляции экспрессии *lac*-оперона. Обычно используют штаммы *E. coli* K-12, *E. coli* ML30 или другие дикие штаммы. Клетки быстро растут в солевой среде, содержащей 0,25—0,50% безвитаминного гидролизата казеина (гидролизованного кислотой) в качестве единственного источника углерода и энергии (разд. 18.4.2). В этих условиях синтез β -галактозидазы при добавлении 1 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозиды в качестве дополнительного индуктора почти не репрессируется.

Аэробную культуру выращивают в течение ночи (15—17 ч при 37°C) в указанных выше условиях, клетки собирают центрифугированием, суспендируют в стерильном 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,5 (или физиологическом растворе), и инокулируют ими среды, состав которых дан в табл. 18.2 (в 125-мл колбы).

В 0 мин и затем с 20—30 мин интервалами отбирают пробы по 1,0, 0,50 или 0,20 мл и добавляют их соответственно в 4,0, 4,5 или 4,8 мл 0,05 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,5, для получения разведений культуры 1:5, 1:10 или 1:25. Начинают с разведения 1:5 и затем переходят к большим разведениям, когда в предыдущем оптическая плотность при 420 нм достигает значения 0,50. Для каждого разведения записывают значения A_{420} и используют их для подсчета сухого веса клеток на основе калибровочной кривой, отражающей зависимость между A_{420} и сухим весом клеток. Эти же разведения обрабатывают одной каплей толуола и одной каплей 0,1%-ного дезоксихолата натрия и инкубируют со встряхиванием при 37°C в течение 15 мин. После инкубации до отбора аликвот (по 0,20 мл) для последую-

Таблица 18.2. Приготовление культур для обнаружения регуляции *lac*-оперона *E. coli* с помощью сАМР

Компоненты	Объем, добавляемый в колбу, мл					
	1	2	3	4	5	6
Основная среда (1,25×ион- ная сила)	16	16	16	16	16	16
Гидролизат казеина (10%- ный)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Дистиллированная вода	3,5	2,5	2,1	1,6	2,1	1,6
Глюкоза (1 М)	—	—	0,4	0,4	0,4 ^a	0,4
сАМР (20 мМ) ^c	—	—	—	0,5	—	0,5 ^d
IPTG (20 мМ)	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Инокулят ^e , около 1 мг/мл клеток (сухой вес)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

^a К этой культуре глюкозу добавляют приблизительно через 150 мин после добавления IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид).

^b сАМР солибилизируют нейтрализацией NaOH.

^c К этой культуре сАМР добавляют приблизительно через 150 мин после внесения IPTG.

^d Клетки добавляют к смеси основной среды, воды и гидролизата казеина и подращивают их около 60 мин. В конце инкубации добавляют IPTG и другие соединения, как указано. Этот момент принимают за точку отсчета времени эксперимента.

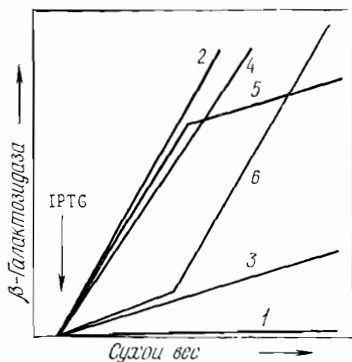
щего анализа на β-галактозидазу (разд. 18.2.8) пробы помещают в ледяную баню.

Строят график роста каждой культуры (на полулוגарифмической бумаге), по оси ординат откладывая количество клеток (сухой вес) в мкг/мл, а по оси абсцисс — время. Еще один график строят на миллиметровой бумаге, откладывая по оси ординат суммарное количество фермента в 1 мл культуры, а по оси абсцисс — количество клеток, сухой вес в микрограммах на 1 мл культуры. Наклон этого графика *R* соответствует скорости синтеза фермента. После расчета удельной активности при каждом определении [в единицах активности на 1 мкг клеток (сухой вес)] строят график зависимости этой величины от времени.

При сравнении культур 1 и 2 выявляется необходимость индуктора для синтеза β-галактозидазы, при сопоставлении культуры 3 с культурой 2 четко видна репрессия глюкозой, а при сопоставлении культуры 4

Рис. 18.7. Регуляция *lac*-оперона *E. coli* циклическим АМР. Все культуры индуцировали IPTG

(изопропил- β -D-тиогаляктопиранозидом), за исключением культуры 1. Среда с культурой 2 в качестве единственного источника углерода и энергии содержит гидролизат казеина. Среда с культурой 3 имеет тот же состав, что и среда с культурой 2, но в нее добавлена еще глюкоза. Среда с культурой 4 имеет тот же состав, что и среда с культурой 3, но в нее добавлен еще сАМР. Среда с культурой 5 имеет тот же состав, что и среда с культурой 3, но через 1—2 ч после начала индукции в нее внесена глюкоза. Среда с культурой 6 имеет тот же состав, что и среда с культурой 4, но через 1—2 ч после начала индукции в нее внесен сАМР.



с культурой 2 обнаруживается снятие этой репрессии экзогенным сАМР. Культуры 5 и 6 демонстрируют репрессию и дерепрессию синтеза β-галактозидазы в различные отрезки времени и в более выраженном виде. Результаты подобного эксперимента представлены на рис. 18.7.

Возможны варианты описанной выше постановки эксперимента, например, можно применять другие субстраты, менять аэробные условия на анаэробные и наоборот, использовать различные мутантные штаммы (например, мутанты *суа* и *срр* и т. д.). Ставя подобные эксперименты, можно изучать регуляцию других ферментных систем, например системы, кодируемой опероном *L*-арабинозы (*ара*), или деградирующую треониндегидратазу, образующуюся только в анаэробных условиях.

18.5. АНАЛИЗ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА

Ферменты существуют не в виде отдельных самостоятельных компонентов, функционирующих независимо и случайно, а в виде ансамблей, отдельные элементы которых взаимосвязаны и выполняют свои функции взаимозависимо в определенной последовательности. Бакте-

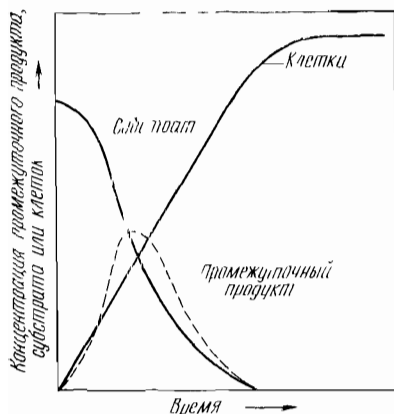


Рис. 18.8. Временное появление промежуточного продукта метаболизма субстрата в процессе роста бактериальной культуры.

аминокислот с разветвленными цепями. Именно изучение таких путей, а не исследование отдельных ферментов способствовало накоплению современных знаний о метаболизме бактерий.

Подробный анализ и оценка имеющихся в настоящее время методик изучения путей метаболизма даны в работе Дэгги и Чэпмена [8]. В последующих разделах данной главы кратко обсуждаются общие методы, описанные этими авторами, и достаточно подробно описано оборудование для радиоизотопных работ. Это поможет получить общее представление о методах изучения путей метаболизма.

18.5.1. Общие методы

Идентификация промежуточных продуктов

В процессе катаболизма некоторых субстратов растущими или покоящимися бактериальными клетками в среде могут накапливаться промежуточные продукты, где их легко идентифицировать различными химически-

риальную клетку можно в действительности рассматривать как одну большую многоферментную систему, работе которой присуща определенная гармония. Помня о целостности системы, в практической работе мы, однако, вынуждены иметь дело с отдельными группами реакций, составляющими те или иные пути метаболизма. Пути метаболизма обычно называют последовательность координированных реакций, имеющих биосинтетическое или биоэнергетическое значение, например цепь переносчиков электронов, гликолитический путь или пути биосинтеза

ми, хроматографическими или радиоизотопными методами. Один или несколько промежуточных продуктов будут накапливаться в том случае, если скорость их синтеза превышает скорость диссимиляции в ходе последующих реакций определенного пути метаболизма. Когда происходит исчерпание исходного субстрата, как показано на рис. 18.8, накопление часто сопровождается потреблением. Например, культуры *E. coli*, растущие на богатой среде с глюкозой в качестве основного источника углерода и энергии, накапливают и затем утилизируют пируват. С помощью такого типа исследований получена существенная информация о путях метаболизма, связанных с разложением ароматических веществ.

Использование ингибиторов метаболизма

В исследованиях путей метаболизма широко используются ингибиторы. При добавлении в культуру ингибитора какого-либо этапа пути метаболизма может происходить накопление одного или нескольких метаболитов, образовавшихся до этого этапа, которые благодаря такому накоплению легко идентифицировать. Получаемую при этом информацию можно использовать для установления последовательности реакций. Например, наши знания о химической природе стенок микробных клеток основаны на том наблюдении, что при обработке клеток *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* или *E. coli* такими антибиотиками, как пенициллин, бацитрацин или циклосерин, накапливаются различные нуклеотиды, участвующие в биосинтезе клеточных стенок. Если ингибиторы (метаболические яды) оказываются эффективными в подобных исследованиях, очевидно, клетки должны быть проницаемыми для них. При оценке данных, получаемых с использованием ингибиторов, всегда следует проявлять осторожность, поскольку могут существовать неизвестные этапы ингибирования.

Использование аналогов субстрата

Ферменты определенного пути метаболизма могут различаться по субстратной специфичности. Например, может оказаться, что первые три фермента способны

взаимодействовать с аналогом природного субстрата, а четвертый — нет. В этом случае будет накапливаться частично метаболизированный аналог, который несложно идентифицировать, благодаря чему легче определить место соответствующих реакций в цепи метаболизма.

Одновременная адаптация

Метод одновременной адаптации основан на следующем логическом построении. Если индуцибельный диссимиляционный путь (например, $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow$ цикл трикарбоновых кислот) индуцируется необходимым для роста субстратом А, у клеток развивается способность к диссимиляции метаболитов В, С, D, так же как и А, но не других веществ, не являющихся промежуточными продуктами этого пути метаболизма. Если, например, путь включает окисление всех указанных компонентов, можно ожидать окисления [измеряемого с помощью аппарата Варбурга (разд. 16.6) или кислородного электрода (разд. 16.2.3)] субстратов А, В, С и D, но не Е, F и G, если только клетки не способны конститутивно утилизировать одно или несколько из последних веществ. Такую способность можно определить с помощью теста на их окисление, используя клетки, выращенные не на субстрате А. Не исключено, однако, что субстраты В, С или D, являясь компонентами пути, не могут проникать в клетки и вследствие этого не будут подвергаться окислению. Для определения этой возможности необходимо использовать клеточные экстракты или пермеабелизованные клетки, обработанные с целью повышения проницаемости.

Использование клеточных экстрактов

Большинство описанных выше методик можно осуществить, используя вместо целых клеток клеточные экстракты. Накопление промежуточных продуктов и (или) кофакторов может происходить спонтанно, или его можно инициировать, используя метаболические яды или аналоги субстратов. При использовании клеточных экстрактов трудности, связанные с проникновением веществ в клетки, устраняются, что упрощает анализ. Од-

нако ферменты изучаемого пути метаболизма не находятся при этом в своей естественной среде, и поэтому их активность может изменяться или они вообще могут быстро инактивироваться.

Использование радиоизотопов

Использование радиоизотопов, в частности соединений, содержащих ^{14}C , ^{32}P , ^3H или ^{35}S , чрезвычайно важное средство изучения путей метаболизма. Описание и оценка различных методик, разработанных для этой цели, содержатся в работах Дэгли и Чэпмена [8], Квейла [35], Уонга [47] и Итона [14], поэтому здесь мы рассмотрим их лишь в общих чертах.

Во-первых, следует отметить, что эти методики имеют свои трудности и «подводные камни». Главнейшая из трудностей связана с необходимостью работы с чистыми веществами. «Перед использованием радиоактивной метки необходима тщательная проверка ее чистоты, так как лучше вообще не работать, чем работать с нечистым исходным веществом» [8]. Плакат с этим предостережением висит сейчас в моей лаборатории. Пытаясь проследить путь второй транспортной системы для глюкозо-6-фосфата, мы потеряли массу времени только на то, чтобы установить, что это артефакт, возникающий из-за присутствия небольшого количества примеси свободной ^{14}C -глюкозы во всех препаратах ^{14}C -глюкозо-6-фосфата, за исключением свежеприготовленных. Эти соединения мы использовали в опытах в качестве субстрата.

Даже при использовании чистых веществ проследить судьбу меченых молекул одного вида среди несметного числа взаимосвязанных и часто обратимых потоков метаболических реакций непросто. Чем быстрее метаболиты входят в активные метаболические пулы, тем труднее выявить их специфические функции. Поскольку активно делящиеся бактерии (в отличие от покоящихся клеток) прежде всего осуществляют реакции синтеза, оборот и перераспределение метаболитов у них сводится к минимуму. Поэтому для радиоизотопного анализа путей метаболизма рекомендуется использовать по возможности активно делящиеся бактерии. Полезно также

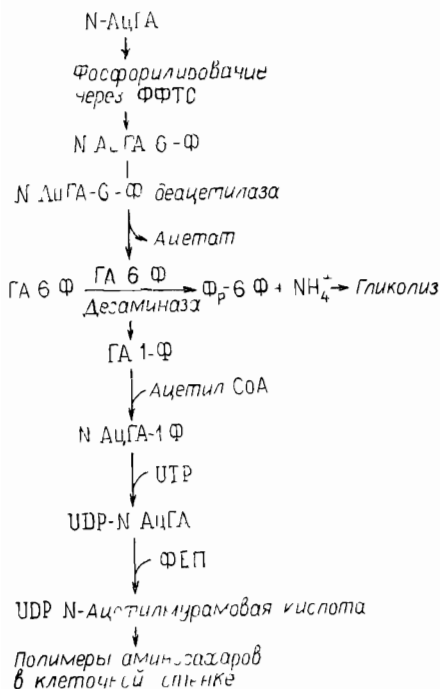


Рис. 18.9. Путь биосинтеза аминоксахаров. N-АцГА — N-ацетилглюкозамин; ФФТС — фосфоенолпируват-фосфотрансферазная система; N-АцГА-6-Ф — N-ацетилглюкозамин-6-фосфат; ГА-6-Ф — глюкозамин-6-фосфат; Фр-6-Ф — фруктозо-6-фосфат; ГА-1-Ф — глюкозамин-1-фосфат; СоА — кофермент А; N-АцГА-1-Ф — N-ацетилглюкозамин-1-фосфат, УТР — уридинтрифосфат; UDP-N-АцГА — уридиндифосфат N-ацетилглюкозамина, ФЕП — фосфоенолпируват; UDP-N-Ацетилмуравовая кислота — уридиндифосфат N-ацетилмуравовой кислоты.

использование соответствующих мутантных штаммов с дефектом, который снижает до минимума или исключает распределение и (или) оборот метаболитов.

На примере биосинтеза аминоксахаров можно показать преимущества, получаемые при использовании радиоактивной метки в экспериментах с соответствующими мутантными штаммами. N-Ацетилглюкозамин транспортируется в клетки с помощью фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы и затем подвергается 1) диссимиляции посредством вступления в гликолитический путь через дезаминирование глюкозамин-6-фосфата с образованием NH_4^+ и фруктозо-6-фосфата и 2) ассимиляции с образованием макромолекул аминоксахаров согласно пути, показанному на рис. 18.9.

Существуют мутантные штаммы *E. coli* K-12, дефектные по N-ацетилглюкозамин-6-фосфатдеацетилазе или глюкозамин-6-фосфатдеаминазе [48]. Рост бездеацети-

лазного мутанта на среде, содержащей подходящий источник углерода и энергии (например, глюконат), в присутствии N-ацетил-(1- ^{14}C)-глюкозамина приводит к накоплению N-ацетилглюкозамин-6-фосфата, т. е. ассимиляция ^{14}C отсутствует. Вместе с тем мутант, не содержащий дезаминазу, специфически включает метку в метаболиты пути биосинтеза аминоксахаров.

Эти мутанты уже были использованы в ряде экспериментов [12, 13], но возможности подобного способа введения метки в определенный путь метаболизма еще далеко не исчерпаны.

В ряде случаев успешно применяется метод быстрого отбора проб. Он оказался эффективным при изучении пути фиксации $^{14}\text{CO}_2$ одноклеточными зелеными водорослями. С его помощью был обнаружен глиоксалатный цикл у *Pseudomonas* и других организмов. Согласно этому методу, радиоактивную метку добавляют к клеткам на очень короткое время (секунды или минуты), а затем сразу же определяют меченые продукты.

Для анализа путей метаболизма можно также использовать метод конкуренции изотопов. Этот метод основан на том, что при мечении всех компонентов, участвующих в определенном пути метаболизма, добавление немеченого компонента вызывает пропорциональное снижение удельной радиоактивности всех метаболитов начиная с добавленного. Робертс и др. [38] широко и успешно применили этот метод в своих классических исследованиях биосинтеза аминокислот у *E. coli*.

Метод радиореспирометрии, разработанный Уонгом [47], относится к классу методов, с помощью которых можно измерять дыхательную активность биологической системы. С его помощью изучают скорость и степень превращения ^{14}C -субстрата (например, 1- ^{14}C -глюкозы, 3,4- ^{14}C -глюкозы или DL-1- ^{14}C -глутамата) в CO_2 , выделяющийся при дыхании. Этот метод используется для анализа путей катаболического дыхания у дрожжей и различных бактерий, включая среди прочих *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Neisseria* и *Escherichia*. Он широко применяется для определения потока углерода через взаимосвязанные пути, такие, как путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, путь

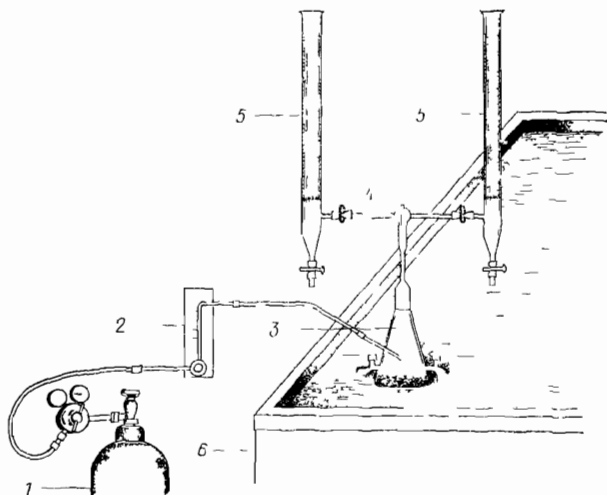


Рис. 18.10. Конструкция радиореспиromетрического устройства. Газ (например, азот или кислород) из резервуара под давлением (1) проходит через измеритель потока газа (2), с помощью которого регулируется постоянная скорость прохождения газа через радиореспиromетрическую колбу (3). Эту колбу можно изготовить из 125—250-мл колбы Эрленмейера. Трубка для ввода газа встроена в колбу таким образом, чтобы регулировалось давление, а постоянный поток газа переносил $^{14}\text{CO}_2$, образуемый в результате метаболизма, из колбы в трехходовой кран (4). Отсюда газ направляется в одну из двух ловушек для CO_2 (5). Сначала $^{14}\text{CO}_2$ собирают в одну ловушку, а затем через определенное время кран поворачивают и $^{14}\text{CO}_2$ собирают во вторую ловушку. К колбе (3) припаявают боковые отводы для добавления субстрата или отбора проб через резиновые пробки. На качалку в водяной бане (6) можно поместить по меньшей мере шесть таких сосудов для одновременного анализа.

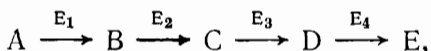
Энтнера — Дудорова, пентозофосфатный путь, путь глюкуроновой кислоты и цикл трикарбоновых кислот.

Как и другие методы исследования, радиореспиromетрия имеет определенные недостатки и ограничения. Как правило, он требует изготовления специального оборудования, которого нет в продаже. Его, впрочем, можно изготовить с минимальными затратами, как, например, в случае блока с шестью сосудами, сделанного в моей лаборатории (рис. 18.10). Стеклодув может легко превратить 250-мл колбы Эрленмейера в сосуды для радио-

респирометрии, а обычные хроматографические колонки — в устройства для улавливания CO_2 . Список необходимого оборудования включает измеритель потока газа, термостатируемую качалку, штатив для укрепления измерителя потока и поглотителя CO_2 , и жидкостный сцинтилляционный счетчик. Ограниченность использования этого метода обусловлена тем, что некоторые соединения, специфически меченные ^{14}C , которые могут потребоваться при проведении определенных работ, отсутствуют в продаже.

Использование индуцированных ауксотрофов

Принципы, лежащие в основе применения ауксотрофных мутантов для изучения различных метаболических путей, в частности путей биосинтеза, хорошо известны, а подробности отбора и использования таких мутантов описаны в другом разделе руководства (разд. 13.6.2). Рассмотрим последовательность пути биосинтеза:



где E — конечный продукт, необходимый для роста культуры. Любая мутация, влияющая на фермент E_1 , E_2 , E_3 или E_4 , приведет к остановке роста культуры, если только не будет обеспечено поступление соответствующего метаболита из другого источника. Этот метаболит, естественно, должен транспортироваться в клетки. Метаболиты, образующиеся перед поврежденной стадией, при наличии достаточных количеств ростовых субстратов будут накапливаться в высоких концентрациях. Идентификация накапливающихся метаболитов и метаболитов, стимулирующих рост мутантных клеток, наряду с соответствующими исследованиями фермента может дать существенную информацию о последовательности реакций данного пути метаболизма. Такие методики с использованием мутантов с большим успехом применяются при изучении синтеза аминокислот с разветвленной цепью, в том числе ароматических аминокислот.

18.5.2. Баланс изотопного углерода

Общие замечания

Представьте следующую гипотетическую ситуацию: вы выделяете культуру новой бактерии, о которой не знаете ничего, кроме того, что она растет в комплексной среде неопределенного состава, содержащей глюкозу. Ваша задача — описать в общих чертах пути метаболизма этой бактерии. Как бы вы приступили к решению этой задачи? Прежде всего возникают вопросы: какие биоэнергетические пути использует бактерия; какое количество углерода глюкозы ассимилируется при биосинтезе, если только это вообще имеет место; в какие макромолекулярные компоненты включается углерод? Чтобы справиться с поставленной задачей, потребуются ответить на все эти вопросы (как и на многие другие, естественно). Экспериментальное определение радиоизотопного баланса служит серьезным фундаментом, на основе которого можно сделать попытку решить эту задачу. Культуру выращивают в течение времени, достаточного для диссимилиации 30—70% добавляемой глюкозы, меченной ^{14}C (равномерно или специфически в положениях C-1, C-3,4 или C-6). В конце выращивания подводят баланс ^{14}C . Полученные при этом данные служат отправной точкой в определении путей метаболизма.

Эксперимент такого рода можно успешно осуществить с культурами дикого штамма *E. coli* ML 30 следующим образом. Культуру *E. coli* в фазе экспоненциального роста переносят в радиореспирометрический сосуд (удобно использовать для этой цели 125-мл колбы Эрленмейера), устроенный таким образом, чтобы был возможен непрерывный ток газа (N_2 , $\text{N}_2\text{—CO}_2$, воздуха, O_2 и т. д.) и отбор образующегося $^{14}\text{CO}_2$ (рис. 18.10). Для добавления субстрата целесообразно снабдить колбы боковыми отводами (закрывающимися газонепроницаемыми пробками, например пробками от пенициллиновых флаконов). Если использовать сосуды с двумя газовыми ловушками, соединенными с помощью трехходового крана, $^{14}\text{CO}_2$ можно отбирать во время опыта через определенные интервалы и использовать его в кинетических исследованиях, в частности, как описано Уонгом [47]

для анализа путей метаболизма с помощью радиореспиromетрии.

Клетки активно растущей культуры *E. coli* собирают, промывают и ресуспендируют в свежей основной солевой среде (разд. 18.4.2), содержащей NH_4^+ , NH_4^+ и гидролизат казеина или любой другой источник азота. Для таких быстро растущих культур, как *E. coli*, в начале эксперимента достаточно 50—100 мкг (сухой вес) клеток на 1 мл среды, для более медленно растущих организмов требуется большая биомасса. Раствор ^{14}C -глюкозы (равномерно меченной с удельной активностью 10^5 имп/мин·мкмоль или выше) помещают в боковой отвод и вливают в сосуд с культурой (конечная концентрация 10 мМ), начиная тем самым эксперимент. Открывают систему газонаполнения, культуру встряхивают (можно поместить все устройство на лабораторную качалку с термостатируемой водяной баней) и начинают отбор газа в ловушки. $^{14}\text{CO}_2$ собирают с помощью газоулавливающего раствора — смеси моноэтаноламина и абсолютного этанола (1:2; 10 мл). Газоулавливающий раствор сливают с 20—30-мин интервалами из колонок, для изготовления которых достаточно иметь стеклянные хроматографические колонки с вплавленным в основание пористым стеклянным фильтром, снабженные отверстиями для ввода газа, как показано на рис. 18.10, и разбавляют абсолютным этанолом до 20 мл. Затем отбирают пробы и определяют радиоактивность (внеся соответствующие поправки на тушение) с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (разд. 16.4.3). Таким образом, подсчитывают общее количество $^{14}\text{CO}_2$, образующегося в результате метаболизма глюкозы.

После 2—3 ч роста в культуру вливают H_2SO_4 для остановки реакции и высвобождения растворенного $^{14}\text{CO}_2$. Пропускание газа продолжают в течение 15 мин, затем устройство демонтируют. После этого культуру обрабатывают описанным ниже способом.

Определение неиспользованного субстрата

Концентрацию глюкозы в начале и в конце периода роста культуры определяют с помощью любой стандартной методики. Разность этих величин равна количеству

глюкозы, потребленной клетками. Поскольку удельная радиоактивность глюкозы известна, можно вычислить процент суммарной активности культуры в минуту, приходящейся на неиспользованную глюкозу. Следовательно, оставшая радиоактивность приходится на CO_2 , газообразные конечные продукты и углерод, ассимилированный клетками.

Определение ассимилированного ^{14}C

Готовят различные разведения выше указанной культуры, фильтруют их через мембранные фильтры (с размером пор 0,45 мкм), промывают и затем измеряют общую радиоактивность, которая соответствует радиоактивному углероду, включенному в клетки.

Можно также отобрать пробу шприцем до остановки роста культуры путем добавления H_2SO_4 , отцентрифугировать ее, промыть свежей средой и вновь отцентрифугировать. После этого осажденные клетки можно фракционировать для выявления распределения ^{14}C между клеточными компонентами с помощью методики, описанной Робертсом и др. [38]. Эта методика полезна при проведении многих исследований. Разработаны также ее модификации, которые в некоторых случаях могут быть более подходящими (разд. 17.1). Осадок клеток сначала суспендируют в 5 мл 5%-ной ТХУ и выдерживают 30 мин в ледяной бане. Отбирают аликвоты суспензии и определяют общую радиоактивность клеток. Затем суспензию центрифугируют и отделяют надосадочную фракцию.

Измеряют радиоактивность этой фракции, которая растворима в холодной ТХУ, содержащей низкомолекулярные вещества. Осадок ресуспендируют в 5 мл 75%-ного этанола, нагревают при 45°C в течение 30 мин и затем центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают и отбирают из нее аликвоту для измерения радиоактивности, присутствующей в спирторастворимой фракции. Осадок ресуспендируют в 5 мл 7,5%-ной смеси этанола и диэтилового эфира (1:1), нагревают при 45°C в течение 30 мин и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают и определяют радиоактивность фракции, растворимой в смеси спирта и эфира. Эти две фракции

содержат суммарные клеточные липиды и некоторые спирторастворимые белки. Осадок ресуспендируют в 5%-ной ТХУ, помещают в кипящую водяную баню на 30 мин и вновь центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают и отбирают пробу этой фракции, растворимой в ТХУ (фракции нуклеиновых кислот), для определения радиоактивности. Осадочную фракцию, нерастворимую в горячей ТХУ (белки и клеточные стенки), ресуспендируют в 0,01 н. NaOH и измеряют в ней радиоактивность. С помощью этой методики определяют не только долю общей радиоактивности субстрата, ассимилированную клетками, но и устанавливают природу тех макромолекул, в которые включился изотоп.

Определение негазообразных конечных продуктов
(см. также разд. 16.3.1 и 16.3.4)

Перед окончанием роста культуры отбирают 5 мл пробы (или больше) и добавляют к 5 мл смеси немеченых соединений, содержащей достаточное количество H_2SO_4 , так чтобы конечный pH был равен 1,5—1,8. При этом происходит остановка реакции и перевод всех присутствующих в среде метаболитов в кислотную форму. Смесь немеченых соединений (при использовании *E. coli*) содержит следующие компоненты, растворенные в основной ростовой среде: этанол, уксусную кислоту, пировиноградную кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, молочную кислоту, янтарную кислоту и лимонную кислоту. Ввиду малых количеств конечных продуктов в 5—10 мл культуральной среды использование смеси немеченых соединений существенно для получения количественного выхода радиоактивных конечных продуктов, образуемых клетками. Концентрация каждого компонента смеси равна 0,1 М, за исключением фумаровой кислоты, концентрация которой составляет 0,05 М. Смесь немеченых соединений вместе с культурой центрифугируют для удаления клеток. Надосадочную жидкость отделяют и хранят до анализа в замороженном состоянии. При исследовании разных организмов требуется приготовление смесей различных немеченых соединений. Их состав, естественно, зависит от природы ко-

нечных продуктов, которые должны накапливаться в культуральной жидкости.

Негазообразные конечные продукты, присутствующие в 1 мл такой пробы, определяют с помощью хроматографии на кремневой кислоте следующим образом. 1 мл пробы смешивают с 1,8 г сухой кремневой кислоты (хроматографической степени чистоты), смесь вносят в верхнюю часть колонки с 5 мл бензола. Для набивки колонки смешивают 10 г кремневой кислоты с 6,5 мл 0,5 н. H_2SO_4 до сыпучего состояния. Добавляют бензол для получения суспензии, которую вливают в колонку, а затем ее промывают бензолом. Колонку набивают под давлением 0,9 кг/м², следя за тем, чтобы материал насадки не подсыхал и не отделялся от стенок колонки. (*Осторожно!* Бензол обладает слабым канцерогенным действием.)

Через колонку пропускают 50 мл хлороформа, а затем 600 мл градиентной смеси, которую готовят следующим образом. В смеситель наливают 300 мл хлороформа, а в резервуар 300 мл 5%-ного раствора *трет*-бутанола в хлороформе. После окончания элюирования добавляют еще 50 мл 5%-ного *трет*-бутанола в хлороформе, а затем 100 мл 10%-ного *трет*-бутанола в хлороформе. Все растворители пропускают через колонку со скоростью 2 мл/мин с помощью насоса. Предварительно их обрабатывают 20 мл 0,5 н. H_2SO_4 (на 1 л растворителя) в делительной воронке, затем «высушивают», фильтруя через два слоя сухой фильтровальной бумаги (не допуская, чтобы водный слой проходил через фильтр).

Фракции по 10 мл собирают с помощью сифона и автоматического коллектора фракций. Из каждой фракции отбирают определенный объем и вносят в флаконы для сцинтилляционного счетчика. Радиоактивность измеряют в соответствующих смесях или жидкостях. Необходимо помнить о поправке на тушение сцинтилляции (за счет хлороформа), которое может иметь место (разд. 16.4.3). Пробы с известным содержанием ^{14}C -этанола, -ацетата, -пирувата, -формиата, -лактата и -сукцината обрабатывают, как описано выше, для определения последовательности их элюирования и процента выхода. Во всех случаях выход составляет в основном

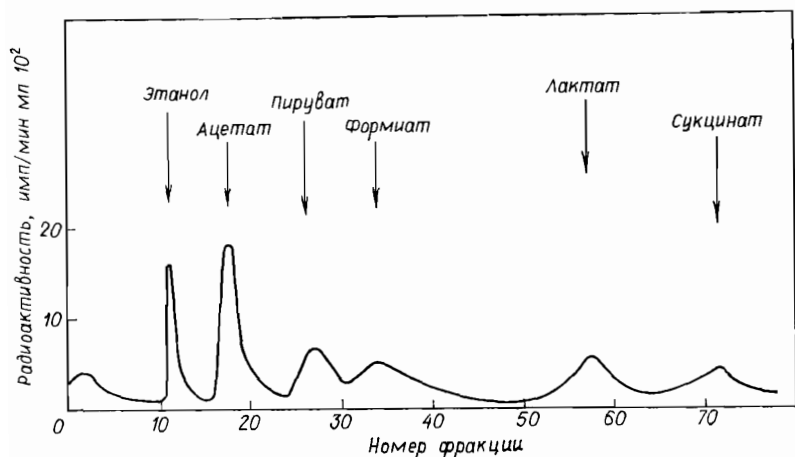


Рис. 18.11. Негазообразные конечные продукты анаэробного метаболизма равномерно меченой ^{14}C -глюкозы у *E. coli*, разделенные методом хроматографии на кремневой кислоте. Радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике.

100% с учетом всех поправок и при постановке необходимых контрольных проб.

Типичная картина хроматографического распределения негазообразных продуктов, образуемых в клетках *E. coli* ML 30 в анаэробных условиях в присутствии ^{14}C -глюкозы и определенных, как описано выше, представлена на рис. 18.11.

Расчет и определение баланса

Подсчитав общую радиоактивность, связанную с каждым из описанных выше этапов, можно представить общую картину и определить некоторые метаболические пути, которые либо используются, либо не используются в данных условиях роста.

В конце периода роста бактерий вся исходная радиоактивность ($R_{\text{исх}}$) должна быть равна сумме радиоактивностей неиспользованного субстрата (S_n), газообразных конечных продуктов (G), ассимилированного углерода (A) и негазообразных конечных продуктов (E).

Если это не соблюдается, то возможна какая-либо экспериментальная ошибка.

Общая радиоактивность, присутствующая в культуре в конце периода роста, равна сумме всех этих радиоактивностей, за исключением радиоактивности углерода в газообразных продуктах ($R_{исх} - G$ или $S_n + A + E$). Если все клетки удаляют центрифугированием в конце периода роста, то общая радиоактивность надосадочной фракции представляет собой лишь сумму радиоактивностей неиспользованного субстрата (S_n) и негазообразных конечных продуктов (E). Величина E равна сумме всех веществ, элюированных из колонки с кремневой кислотой. Если это не так, то не исключено, что в растворе присутствует конечный продукт, не обнаруживаемый в указанных условиях.

Установив балансовые взаимоотношения и определив путь превращений углерода, можно сделать некоторые общие заключения, касающиеся биоэнергетических и биосинтетических путей метаболизма. Например, появление радиоактивности в клеточной фракции, не растворимой в горячей ТХУ, означает участие меченого субстрата в биосинтезе аминокислот или реакциях биосинтеза клеточных стенок. Природа образующихся газообразных и негазообразных конечных продуктов и их соотношение могут служить ключом к определению типов биоэнергетических путей, используемых в условиях роста, применявшихся в эксперименте. Проводя подобные исследования в изменяющихся условиях роста бактерий (в аэробных и анаэробных, на богатой и бедной среде, в присутствии и в отсутствие различных ингибиторов и т. д.), можно получить дополнительные сведения в этом отношении.

18.5.3. Наличие ключевых ферментов

Другой необходимый этап работы, направленный на выявление какого-либо пути метаболизма, заключается в определении тех ферментов, которые отличают один путь от другого, т. е. являются ключевыми ферментами того или иного пути метаболизма. Разработаны методики определения ключевых ферментов, участвующих во многих классических путях диссимиляции углеводов,

Таблица 18.3. Ключевые ферменты основных путей метаболизма

Путь метаболизма	Ключевые ферменты	Источник
Путь Эмбдена—Мейергофа — Парнаса (гликолитический путь)	Киназы, фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолаза	[50]
Гексозомонофосфатный и пентозофосфатный пути	Глюкозо-6-фосфат - дегидрогеназа, трансальдолаза, транскетолаза	[36]
Фосфокетолазный путь	Фосфокетолаза	
Путь Энтнера — Дудорова	Фосфо-2-кето-3-дезоксиглюконат — альдолаза	
Прямое окисление	Глюкозо- и глюконатдегидрогеназы	
Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса), глюноксилатный цикл	Цитрат-синтаза, цитрат — оксалацетат-лиаза, аконитат-гидратаза, изоцитратдегидрогеназа, оксальсукцинатдекарбоксилаза, α -кетоглутаратдегидрогеназа, липонил-редуктазотранссуццинилаза, липоамид-дегидрогеназа (NAD^+), суццинил-СоА — синтетаза, суццинил-СоА — гидролаза, фумарат-гидратаза, малатдегидрогеназа, изоцитрат-лиаза, малат-синтаза, система пируватдегидрогеназы	[39]
Метаболизм CO_2	Различные карбоксилазы, декарбоксилазы и т. д.	[39]

Прекрасное общее описание таких методов дано в книге «Methods in Microbiology». Специальная подробная информация, необходимая для выполнения таких методик, содержится в книге «Methods in Enzymology». Ключевые ферменты основных путей метаболизма с указанием соответствующих источников данных перечислены в табл. 18.3.

18.6. ЛИТЕРАТУРА

1. Arrigoni D., Singer T. P. Nature (London), **183**, 1256—1258 (1962).
2. Atkinson D. E. Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, Inc., New York, 1977.
3. Bender R. A., Janssen K. A., Resnick A. D., Blumberg M., Foor F., Magasanik B. J. Bacteriol., **129**, 1001—1009 (1977).

4. *Buttin G. J.* Mol. Biol., **7**, 164—182 (1963).
5. *Clarke P. H.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **6A**, p. 269—326, Academic Press, Inc., New York, 1971.
6. *Coakley W. T., Bater A. J., Lloyd D.* Adv. Microb. Physiol., **16**, 279—341 (1977).
7. *Cota-Robles E. H., Stein S.* In: A. I. Laskin and H. A. Lechevalier (ed.), *Handbook of microbiology*, vol. **2**, p. 833—843, CRC Press, Cleveland, Ohio.
8. *Dagley S., Chapman P. J.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), vol. **6A**, p. 269—326, Academic Press, Inc., New York, 1971.
9. *Decker L. A. (ed.)*. *Worthington enzyme manual*, Worthington Biochemicals Corp., Freehold, N. J., 1977.
10. *Dobrogosz W. J. J.* Bacteriol., **91**, 2263—2269 (1966).
11. *Dobrogosz W. J. J.* Bacteriol., **95**, 578—584 (1968).
12. *Dobrogosz W. J. J.* Bacteriol., **95**, 585—591 (1968).
13. *Dobrogosz W. J. J.* Bacteriol., **97**, 1083—1092 (1969).
14. *Eaton N. R.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **6B**, p. 231—246, Academic Press, Inc., New York, 1972.
15. *Eisenberg R. C., Dobrogosz W. J. J.* Bacteriol., **93**, 941—949 (1967).
16. *Ferdinand W.* *The enzyme molecule*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1976.
17. *Gachelin G.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **34**, 382—387 (1969).
18. *Hatfield G. W., Umbarger H. E.* *Methods Enzymol.*, **17B**, 561—566 (1971).
19. *Hess B.* In: H. H. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, p. 43—55, Academic Press, Inc., New York, 1963.
20. *Hirata M., Tokushige M., Tnagaki A., Hayaiski O.* J. Biol. Chem., **240**, 1711—1717 (1965).
21. *Holzer H., Duntze W.* Annu. Rev. Biochem., **40**, 345—374 (1971).
22. *Hughes D. E., Wimpenny W. T., Lloyd D.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **5B**, p. 1—54, Academic Press, Inc., New York, 1971.
23. *Kaback H. R.* *Methods Enzymol.*, **22**, 99—120 (1971).
24. *Kingdom H. S., Stadtman E. R. J.* Bacteriol., **94**, 949—957 (1967).
25. *Koch A. L. J.* Mol. Biol., **59**, 447—459 (1971).
26. *Leive L. J.* J. Biol. Chem., **243**, 2373—2380 (1968).
27. *Lowe R. H., Evans H. J.* Biochim. Biophys. Acta, **85**, 377—389 (1964).
28. *Masters C. J.* Curr. Top. Cell. Regul., **12**, 75—105 (1977).
29. *McClure W. R.* Biochemistry, **8**, 2782—2786 (1969).
30. *Mecke D., Wulff K., Holzer H.* Biochim. Biophys. Acta, **128**, 559—567 (1966).
31. *Neidhardt F. C., Boyd R. F.* *Cell biology: a laboratory text*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn., 1965.
32. *Neu H. C., Heppel L. A. J.* J. Biol. Chem., **239**, 3893—3900 (1964).
33. *Neu H. C., Heppel L. A. J.* J. Biol. Chem., **240**, 3685—3692 (1965).
34. *Pardee A. B., Jacob F., Monod J. J.* Mol. Biol., **1**, 165—178 (1959).
35. *Quayle J. R.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in*

- microbiology, vol. **6B**, p. 157—183, Academic Press, Inc., New York, 1972.
36. *Reeves H. C., Rabin R., Wegener W. S., Aji S. J.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **6A**, p. 425—462, Academic Press, Inc., New York, 1971.
 37. *Repaske R.* *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 189—191 (1956).
 38. *Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T., Britten R.* *Studies of biosynthesis in Escherichia coli*. Carnegie Inst. Washington Publ., 607 (1957).
 39. *Scruton M. C.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **6A**, p. 479—541, Academic Press, Inc., New York, 1971.
 40. *Shapiro B. M., Stadtman E. R.* *Methods Enzymol.*, **17**, 910—922 (1970).
 41. *Smyrniotis P. Z.* *Methods Enzymol.*, **5**, 344—347 (1962).
 42. *Sols A., Reeves R. E., Gancedo C.* In: E. H. Fischer, E. G. Krebs, H. Neurath, and E. R. Stadtman (ed.), *Metabolic inconversion of enzymes*, p. 393—399, Springer-Verlag, Berlin, 1973.
 43. *Sols A., Salas M. L.* *Methods Enzymol.*, **9**, 436—442 (1966).
 44. *Stadtman E. R., Chock P. B., Adler S. P.* In: S. Shaltiel (ed.), *Metabolic interconversion of enzymes*, p. 142—149, Springer-Verlag, Berlin, 1976.
 45. *Stadtman E. R., Smyrniotis P. Z., Davis J. N., Wittenberger M. E.* *Anal. Biochem.*, **95**, 275—285 (1979).
 46. *Umbarger H. E.* In: A. I. Laskin and H. A. Lechevalier (ed.), *Handbook of microbiology*, vol. **4**, p. 35—42, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
 47. *Wang C. H.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **6B**, p. 185—230, Academic Press, Inc., New York, 1972.
 48. *White R. J.* *Biochem. J.*, **106**, 847—858 (1968).
 49. *Wilson D. M., Alderte T. F., Maloney P. C., Wilson T. H.* *J. Bacteriol.*, **126**, 327—337 (1976).
 50. *Wood W. A.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. **6A**, p. 411—424, Academic Press, Inc., New York, 1971.
 51. *Yamanka K., Wood W. A.* *Methods Enzymol.*, **9**, 596—602 (1966).

ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ТРАНСПОРТ

Р. Маркис

Хотя детали прохождения растворенных веществ через барьеры проницаемости бактериальных клеток на молекулярном уровне по существу неизвестны, все же можно различать процессы двух основных типов — пассивное проникновение и (активный) транспорт.

Проникновение — это пассивный переход растворенного вещества внутрь клетки (поглощение) или из клетки наружу (выделение) путем диффузии, которому может способствовать химическое взаимодействие между растворенным веществом и какой-либо клеточной структурой, например мембраной. Клетка может быть проницаемой или непроницаемой для данного вещества. *Проницаемость* — это свойство клетки, а не растворенного вещества. Проникновение растворенного вещества через клеточную мембрану можно описать уравнением

$$dS/dt = PA(\Delta C),$$

где dS/dt — изменение количества растворенного вещества внутри клетки в единицу времени, P — коэффициент проницаемости (с размерностью расстояние/время), A — площадь мембраны и ΔC — разность концентраций растворенного вещества внутри и вне клетки. Если построить график, отложив внутреннюю концентрацию растворенного вещества ($C_{\text{внутр}}$) как функцию времени, то получится параболическая кривая, которая переходит в плато при $C_{\text{внутр}} = C_{\text{внешн}}$, т. е. когда внутренняя концентрация равна внешней или, точнее, когда активность растворенного вещества внутри клетки равна активности его вне клетки. Для такой кривой $C_{\text{внутр}} = (\text{max } C_{\text{внутр}}) (1 - e^{-kt})$, где k — константа, а t — время.

Транспорт — это процесс активного перемещения растворенного вещества в клетку или из клетки, который связан с метаболизмом и в котором могут участвовать энергизованные переносчики. У бактерий наиболее изучены два класса транспортных систем — фосфотранс-

феразные и так называемые пермеазные системы [15, 34]. Фосфотрансферазная система встречается главным образом у факультативных анаэробов и предназначена для транспорта сахаров [39], тогда как пермеазные системы для транспорта аминокислот, сахаров, неорганических ионов и предшественников нуклеиновых кислот имеются почти у всех бактерий.

Кривая, описывающая ход поглощения растворенного вещества во времени, для процессов транспорта качественно не отличается от аналогичной кривой для пассивного проникновения. Однако активное поглощение не прекращается при $C_{\text{внутр}} = C_{\text{внешн}}$, а продолжается — теперь уже в форме так называемого концентрирующего транспорта — до тех пор, пока будет создан значительный градиент концентрации. Максимальное поглощение определяется соотношением между скоростями процессов, направленных внутрь и наружу.

Как уже говорилось, путем транспорта может осуществляться и выделение, и поглощение растворенных веществ клетками. Многие растворенные вещества транспортируются в ходе так называемой *обменной диффузии*, т. е. при обмене внутренних и наружных веществ через мембрану в соотношении 1:1. Такой обмен обычно изучают при помощи растворенных веществ с радиоактивной меткой [13].

Концентрирующее поглощение растворенных веществ не требует обязательного участия мембраны и транспортных катализаторов. Ионообменные смолы, например, способны поглощать и концентрировать ионы. Большинство органических компонентов клетки находятся не в водном растворе, а в твердых фазах клеточной стенки, мембран, рибосом, нуклеоида и т. д. и потому могут поглощать растворенные вещества так же, как смола. Этот аспект транспорта и проникновения растворенных веществ рассмотрен в обзоре Дамадьяна [12].

19.1. ПРОНИЦАЕМОСТЬ

19.1.1. Методика измерения

Проникновение растворенного вещества в бактериальные клетки или клеточные структуры чаще всего измеряют с помощью объемного метода или метода кон-

центрированной взвеси, описанного Конвэем и Дауни [11] и модифицированного Митчеллом и Мойлом [32], Мак-Дональдом и Герхардтом [26] и другими. В этом случае используют обычно большие массы клеток — 3 г и больше (влажных клеток) на пробирку. Получение такого количества клеток может представлять проблему, однако не слишком сложную при использовании обычных лабораторных культур. Методы, требующие меньшего количества клеток и основанные на применении мембранных фильтров или мини-центрифуги, описаны в разделе о транспорте (разд. 19.2). В любом случае следует уделять внимание деталям, касающимся выращивания и сбора клеток, так как проницаемость бактерий может сильно изменяться в течение цикла развития периодической культуры или в результате отмывания клеток от компонентов среды. Часто удобнее использовать клетки, полученные в результате непрерывного культивирования. Изменения среды, ее температуры, pH и т. д. тоже могут приводить к изменению проницаемости.

Объемный способ предназначен специально для того, чтобы определять, в какую долю объема (пространства) клеток может проникать изучаемое растворенное вещество. Этот метод основан просто на оценке степени разбавления раствора этого вещества после смешивания его с клетками, осажденными центрифугированием. Необходимы следующие данные: начальный объем и начальная концентрация изучаемого раствора; объем осажденных клеток; конечная концентрация растворенного вещества во внеклеточной фазе смеси осадка и раствора. Клеточный осадок состоит не только из клеток, но и из межклеточного пространства. Объемную долю межклеточного пространства обычно определяют с помощью растворимых высокомолекулярных полимеров, способных проникать в межклеточное пространство, но не в клетки.

Ниже приводится поэтапное описание методики.

1. Отмывание клеток

Перед определением проницаемости собранные клетки необходимо отмыть. Однократное промывание большим количеством жидкости обычно позволяет в основ-

ном отмыть клетки от компонентов среды, но не удаляет из них в достаточной мере внутренние растворенные вещества. Часто требуется двукратное отмывание, трехкратное же вряд ли оправданно. Клетки многих бактерий, особенно грамположительных, достаточно устойчивы и не подвергаются существенному повреждению при отмывании водой или разбавленными буферными растворами, в особенности охлажденными. Однако многие бактерии — прежде всего грамотрицательные — гораздо чувствительнее, и промывание водой может привести к сильному повреждению клеток. К тому же при отмывании клеток грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий часто наиболее эффективны теплые, а не охлажденные жидкости. Растворы, чаще всего применяемые для отмывания грамотрицательных бактерий, содержат ионы магния (обычно 50 мМ), буфер (например, 50 мМ фосфатный буфер или трис-буфер) и осмотический стабилизатор (например, 0,4 М NaCl или 0,5 М сахарозу). Малони и др. [3] рекомендуют отмывать клетки *Escherichia coli* ростовой средой 63, не содержащей, однако, источника углерода. При работе с ранее не использовавшимися бактериями целесообразно методом проб подобрать наилучший раствор. Критерием эффективности служит удаление компонентов среды при сохранении внутриклеточных пулов калия, аминокислот или неорганического фосфата. Идеального промывного раствора не существует, и обычно приходится идти на некоторый компромисс. Если для определения проницаемости используют густые клеточные суспензии, состав промывной жидкости (и суспензионной среды) не так важен, как в случае применения разбавленных суспензий для анализа транспорта. (См. также разд. 10.4.2 и 25.1.)

2. Центрифугирование клеток

После отмывания клетки центрифугируют для получения достаточно плотного осадка. Режим центрифугирования зависит от конкретной культуры. В опытах с рядом клеточных суспензий получают кривую формирования осадка (вроде изображенной на рис. 19.1), откладывая вес осадка против времени центрифугирования,

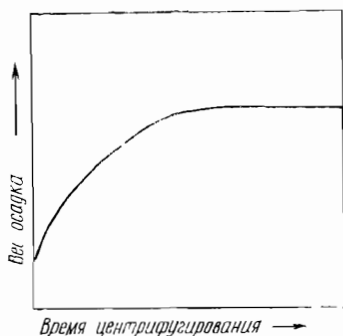


Рис. 19.1. Типичная кривая образования осадка клеток.

При подготовке суспензии для исследования проницаемости клетки нужно центрифугировать значительно дольше того времени, при котором начинается горизонтальный участок кривой, чтобы небольшие отклонения во времени центрифугирования не влияли на вес осадка. Последнее центрифугирование перед добавлением растворенного вещества обычно проводят в тарированной центрифужной пробирке, для того чтобы

можно было определить вес осадка. Пробирки с номинальной емкостью 50 мл наиболее удобны для сбора осадков весом около 10 г (во влажном состоянии), а 15-мл пробирки хороши для осадков весом около 3 г. Для рутинных анализов достаточна точность взвешивания до 0,01 г. Перед взвешиванием осторожно сливают надосадочную жидкость, переворачивают пробирки для максимального и одинакового слива, а избыток влаги внутри пробирок удаляют впитывающей воду тканью. Однако не следует пытаться промокнуть воду с осадка, так как вместе с водой можно удалить и часть клеток.

3. Измерение веса и объема осадка

Вес влажного осадка обычно служит достаточно точным показателем его объема, и в расчетах им можно заменить объем, так как плотность влажных вегетативных бактериальных клеток обычно составляет около 1,02—1,04 г/мл. Однако влажные споры бактерий имеют значительно большую плотность (например, 1,22 г/мл у спор *Bacillus stearothermophilus*), и вес осадка уже не будет эквивалентен объему. Некоторые включения (например, гранулы поли-β-гидроксibuтирата) вегетативных клеток также имеют относительно высокую плотность во влажном состоянии, что может значительно увеличить разницу между весом и объемом осадка.

Объем осадка можно легко определить с помощью стандартного пикнометра или мерной колбы. Пусть, например, нужно измерить объем клеточного осадка весом около 3 г. Тогда осадок можно смешать с водой и перенести в 50-мл тарированный пикнометрический сосуд или мерную колбу, а затем довести до нужного объема водой. Допустим, что вес суспензии, определенный с помощью аналитических весов, равен 50,110 г (вес смеси и пикнометра минус вес пикнометра), а откалиброванный объем пикнометра равен точно 50,000 мл при 25°C (температура взвешивания). Предположим также, что вес осадка, найденный с помощью аналитических весов, составляет ровно 3,000 г. Тогда вес воды, добавленной к осадку, должен быть равен (50,110—3,000) г, т. е. 47,110 г. При 25°C такой вес воды занял бы объем 47,249 мл, что можно определить по плотности воды при этой температуре, указанной в стандартных химических справочниках. Следовательно, объем осадка равен 50,000—47,249, или 2,751 мл. Тогда плотность составит 3,000 г/2,751 мл, или 1,090 г/мл. При известной плотности и стандартных условиях центрифугирования можно легко вычислить объем осадка по его весу.

Объем осадка можно также определить непосредственно в тарированной центрифужной пробирке, закрытой покровным стеклом известного веса [10]. Бортики стеклянной пробирки необходимо плоско сточить, поликарбонатные же пробирки изготавливаются с плоскими краями. Общий объем пробирки определяют, заполнив ее дистиллированной водой и закрыв покровным стеклом (при этом не должно быть пузырьков воздуха в пробирке или воды на ее наружной поверхности). Определив вес воды в пробирке, находят объем последней по плотности воды при данной температуре.

Объемы осадков определяли также непосредственно, используя тарированную центрифужную пробирку [12], что дает цитокритные данные, эквивалентные гематокритным, получаемым в повседневной гематологической практике. Этот цитокритный метод позволяет получать полезные оценки объема, однако на практике он связан с некоторыми трудностями.

4. Смешивание клеток с раствором и инкубирование

Клеточный осадок, используемый для определения проницаемости, доводят до нужной температуры и смешивают с раствором изучаемого вещества при помощи стеклянной или покрытой тефлоном палочки, не адсорбирующей жидкость: объем раствора должен быть примерно равен объему осадка. Желательно получить достаточное разбавление, чтобы можно было легко определить разницу концентраций. После перемешивания осадка и раствора суспензию инкубируют в течение известного времени при температуре эксперимента, чтобы могло установиться диффузионное равновесие, — обычно от 15 мин до 1 ч. Лучше всего убедиться, что равновесие действительно устанавливается в течение принятого времени инкубации; для этого проводят опыты с различными осадками и разными периодами инкубации.

5. Повторное центрифугирование

После инкубации каждую смесь осадка с испытуемым раствором центрифугируют в течение достаточного времени, чтобы получить для анализа надосадочную жидкость без клеток. Может потребоваться ее дополнительное центрифугирование для осветления.

6. Определение концентраций растворенного вещества

Концентрации растворенного вещества следует определять и в исходном растворе, который смешивают с клеточным осадком, и в конечном, полученном после повторного центрифугирования. Обычно для этого можно брать небольшие пробы и использовать гравиметрический или рефрактометрический метод. Однако эти методы неспецифичны, и поэтому примесь других веществ, специально добавляемых к суспензии или переходящих в нее из клеток, может создать помехи. В этом случае применяют более специфические химические или радиоизотопные методы.

19.1.2. Определение межклеточного пространства

Для того чтобы вычислить объем клеток, доступных для проникновения испытуемого вещества, нужно узнать объем межклеточного пространства в осадке. Соответственно один осадок из каждой опытной серии следует смешать с раствором высокомолекулярного полимера, все молекулы которого слишком велики, чтобы пройти через клеточные стенки, и попадают лишь в межклеточное пространство. Лучше всего для этой цели подходит препарат декстрана со средней мол. массой 2 000 000 (Dextran T2000, Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, New Jersey). Декстраны полидисперсны, но даже наименьшие молекулы столь высокомолекулярного препарата не проходят через клеточные стенки бактерий [41].

Концентрацию декстрана обычно определяют методами гравиметрии или рефрактометрии либо химическим методом — с помощью фенола и серной кислоты [13]. Но эти методы не специфичны в отношении декстрана, и определению могут мешать другие вещества, специально добавленные в среду или перешедшие в нее из клеток. Было бы удобно использовать декстраны с радиоактивной меткой, но средняя молекулярная масса самых крупных из коммерчески доступных меченых декстранов (например, поставляемых фирмой New England Nuclear Corp.) составляет всего лишь около 70 000. Самые мелкие молекулы этого препарата могут проходить через клеточные стенки некоторых бактерий, хотя и не всех. Поэтому в одних случаях этот препарат пригоден, а в других нет, и, прежде чем использовать его в опытах с определенными клетками, нужно определить порог их проницаемости. Конечно, можно метить более крупные молекулы декстрана ^{14}C -цианидом с помощью обычных методов получения карбоксил-декстрана. Для колориметрических анализов использовали синие декстраны (Pharmacia), но клетки бактерий могут окраситься при контакте с синим декстраном вследствие переноса красителя.

Вместо декстранов можно использовать некоторые другие полимерные молекулы. Белки (например, сывороточный альбумин) имеют то преимущество, что они

в основном моодисперсны и поддаются специфическому анализу. Недостаток же их в том, что они могут связываться с клетками, и это приводило бы к получению завышенных величин поглощения. Использовали также инсулин, но он способен проникать через клеточные стенки многих бактерий, особенно грамположительных [41].

Еще одна трудность при определении межклеточного объема связана с набуханием и сжатием бактериальных клеток под воздействием многих растворов, особенно растворов солей. Иногда бывает необходимо определить межклеточный объем в присутствии такого растворенного вещества и декстрана. Если молекулы этого растворенного вещества невелики (например, в случае NaCl или KCl), можно диализовать надосадочную жидкость, удерживая крупные молекулы декстрана в диализном мешке и постепенно удаляя малые молекулы растворенного вещества; тогда в диализном мешке окажется весь декстран, необходимый для анализа.

19.1.3. Выражение результатов

Наиболее распространенный, по крайней мере в бактериологии, показатель проницаемости — это величина занимаемого пространства S , которую можно вычислить по формуле

$$S = \left(\frac{V_s}{V_p} \right) \left(\frac{C_0}{C_f} - 1 \right),$$

где V_s — объем раствора, добавленного к осадку, V_p — объем осадка (часто вместо этой величины используют W_p — вес влажного осадка), C_0 — начальная концентрация растворенного вещества и C_f — его конечная концентрация. Значения S отражают долю объема клеточного осадка, в которую проникает растворенное вещество.

Однако нас интересует доля действительного объема самих клеток, а не осадка, т. е. значение R . Его вычисляют по формуле

$$R = (S_{\text{sol}} - S_{\text{dex}}) / (1 - S_{\text{dex}}),$$

где S_{sol} — объем, занимаемый исследуемым растворен-

ным веществом, а S_{dex} — объем «декстранового», или межклеточного, пространства. Нулевая величина R означает, что клетки непроницаемы для растворенного вещества. Величины R от 0 до 1 означают различную степень проницаемости. $R > 1$ означает, что растворенное вещество концентрируется в клетках.

При использовании веса осадка как меры его объема обозначения S и R часто сопровождают индексом w . Кроме того, часто желательно бывает отнести полученный результат к единице веса клеток или объема клеточной воды, например указать клеточный объем, проницаемый для сахарозы, на 1 г сухого веса клеток или на 1 мл клеточной воды.

19.1.4. Определение объема клеток

Из найденных значений занимаемого объема (S) можно извлечь полезную цитологическую информацию, например получить наиболее точные данные о средней величине клеток той или иной бактерии. Разность между объемом осадка и межклеточным объемом равна объему клеток. Если осадок ресуспендировать в воде до определенного объема (скажем, 50 мл) в мерной колбе, то можно определить число клеток с помощью камеры Петрова — Хауссера, а затем вычислить средний объем клетки. Этот метод можно также использовать для определения объема протопласта в клетке (разд. 19.3.2).

19.1.5. Определение содержания воды в клетке (см. также разд. 25.2)

Ресуспендированные клетки можно также использовать для определения их сухого веса, что позволяет вычислить сухой вес отдельной клетки. Количество клеточной воды равно разности между сырым и сухим весом клетки. Поскольку вес или объем межклеточной воды известен, можно определить количество клеточной воды по количеству воды в осадке.

Иногда удобно определять содержание воды в клетках непосредственно по значению R для таких растворенных веществ, как $^2\text{H}_2$, ^{14}C -мочевина или ^{14}C -глице-

рин, которые легко проникают в покоящиеся клетки, но не концентрируются в них. Иногда для определения количества клеточной воды используют и воду, меченную тритием, но необходимо помнить, что тритий может быстро обмениваться на обычный водород различных клеточных полимеров и мономеров, особенно содержащих ионизируемые компоненты.

19.1.6. Общие замечания

Основные достоинства объемного метода — простота и надежность. Однако он не совсем пригоден для кинетических измерений, так как довольно много времени уходит на смешивание клеток с испытуемым раствором и их последующее разделение. Таким образом, этот способ хорош для определения равновесных условий, но не для измерения скорости процессов. При использовании очень концентрированных суспензий обычно не возникает трудностей, связанных с избыточным выщелачиванием из клеток физиологически важных растворенных веществ (например, ионов калия). Однако густота суспензии затрудняет контроль рН или достаточную аэрацию аэробных культур. Таким образом, этот способ наиболее полезен при изучении покоящихся клеток и менее пригоден в случае активно метаболизирующих бактерий. Как уже упоминалось, может стать проблемой получение большой клеточной массы. Между тем точность метода зависит от наличия больших количеств клеток — в основном потому, что поглощение растворенного вещества определяется по изменению его концентрации в суспендирующей среде.

19.2. ТРАНСПОРТ

19.2.1. Методика анализа

1. Подготовка клеток

Для изучения скоростей транспорта растворенных веществ нужно иметь возможность быстро отделять клетки от среды, в которой они суспендированы. Обычно

это делают путем фильтрации через мембранные фильтры, поэтому лучше использовать разбавленные суспензии. Для фильтрации проб объемом 1 мл через фильтр диаметром 25 мм обычно приходится готовить клеточную суспензию, содержащую менее 200 мкг сухого вещества в 1 мл.

Как и при определении проницаемости, при изучении транспорта необходимо уделять большое внимание контролю условий выращивания и сбора клеток. При исследовании процессов транспорта очень важен выбор сред для отмывания и суспендирования, так как клетки в разбавленных суспензиях более чувствительны к неблагоприятным факторам, чем в густых взвешях, где содержатся большие количества веществ, выделяемых самими клетками.

При изучении транспортных процессов может потребоваться предварительная обработка клеток; например, используют голодание, чтобы истощить эндогенные пулы аминокислот. Голодание может быть особенно полезным при добавлении в среду веществ с радиоактивной меткой, так как оно уменьшает изменения удельной активности в результате разбавления внутриклеточными немечеными веществами. Однако голодание может привести и к исчерпанию в клетках аденозинтрифосфата или фосфоенолпирувата или же к снижению протонодвижущей силы. Поэтому может потребоваться внесение (наряду с испытуемым растворенным веществом) какого-либо субстрата для поддержания транспортных процессов.

2. Смешивание клеток с раствором и инкубирование

Клеточную суспензию и раствор испытуемого вещества доводят отдельно до температуры, выбранной для эксперимента, а затем смешивают, отмечая этот момент как нулевое время. Обычно смешивать надо быстро, так как большинство транспортных процессов протекает с высокой скоростью. Реакционную смесь инкубируют, как правило, недолго (например, 10 мин).

3. Отбор проб и разделение

Пробы реакционной смеси отбирают через короткие интервалы времени (например, 1 мин). Клетки и испытуемый раствор быстро разделяют, обычно путем фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, предварительно смоченный промывным или испытуемым раствором. Можно использовать фильтры и с меньшим размером пор, но они оказывают большее сопротивление потоку жидкости и замедляют процесс фильтрации. Фильтры с размером пор 0,45 мкм пригодны для отделения большинства микробных клеток. Обычно используют ацетатцеллюлозные и нитратцеллюлозные фильтры, особенно если планируется сцинтилляционный счет радиоактивности. Вакуум в приемной колбе создается с помощью лабораторной вакуумной линии или, если этого недостаточно, с помощью вакуумного насоса. Используемую обычно в воронках для фильтрования насадку с зажимом можно заменить изготовленным на заказ тяжелым латунным кольцом для удерживания диска фильтра. Кольцо можно быстро устанавливать и снимать, что позволяет повторно использовать одну и ту же фильтровальную установку. Можно также приобрести или изготовить установку для одновременного фильтрования через ряд независимых фильтров, дающую возможность очень быстро отбирать пробы.

Иногда удобно смешивать компоненты в шприце с приставкой для фильтрования Swinney, с помощью которой можно выдавливать пробы среды, освобожденной от клеток. Недостаток этого метода состоит в том, что для оценки поглощения приходится определять разности концентраций растворенных веществ в суспендирующей среде. Кроме того, отбор приводит к постепенному повышению концентрации в оставшейся части смеси.

В некоторых случаях можно отделять клетки центрифугированием, даже если требуются кинетические данные. Мини-центрифуги с маленькими пробирками объемом 250—1500 мкл могут за несколько секунд набирать скорость, соответствующую 12 000 g. Левин и Фриз [25] описали метод оценки поглощения растворенных веществ клетками *Bacillus subtilis* с помощью так называемой мини-фуги.

Кроме того, часто можно останавливать транспортные реакции, помещая пробы в лед или в охлажденный до температуры льда буфер. Последующее центрифугирование проводят на холоду. Для успешного применения этой методики необходимо, чтобы охлаждение приостанавливало процесс поглощения, но не вызывало выхода веществ из клетки. Такая процедура дает хорошие результаты чаще с грамположительными, чем с грамотрицательными бактериями.

В некоторых случаях нет необходимости отделять клетки от раствора. Например, ионселективные электроды позволяют вести непрерывное наблюдение за рН, парциальным давлением кислорода (pO_2), содержанием ионов калия и т. п. (разд. 16.2). Более того, при изучении поглощения солей часто достаточно бывает лишь следить за изменением проводимости суспендирующей среды с помощью обычной кондуктометрической ячейки.

4. Отмывка клеток

Клетки, остающиеся на фильтре, обычно необходимо промыть для удаления компонентов среды с их поверхности. Промывная жидкость должна быть осмотически забуференной, особенно для грамотрицательных бактерий, так как транспортные системы чувствительны к осмотическому давлению. Для промывания часто используются концентрированные растворы сахаров (например, 0,5 М раствор сахарозы). Можно также добавлять ионы марганца (обычно 50 мМ) в виде хлорида или сульфата. Идеальный промывной раствор должен в основном удалять исследуемое вещество из осадка клеток и фильтра при первом же промывании. Однако обычно приходится идти на определенный компромисс (дополнительные сведения см. в разд. 19.1.1).

Иногда можно избежать необходимости промывания клеток, центрифугируя их через слой жидких силиконов, как описано Гурвицем и др. [17]. Клетки проходят через силикон и образуют осадок, не содержащий межклеточной воды. Немного воды может остаться на поверхности клеток, и вода клеточных стенок также не удаляется.

5. Удаление клеток и их анализ на содержание исследуемого вещества

Клетки можно элюировать с фильтра, ресуспендировать до известного объема и определять содержание в них изучаемого вещества химическим (гл. 17) или радиометрическим способом (разд. 16.4).

При использовании радиоактивных растворенных веществ чаще всего фильтры высушивают и помещают прямо в сцинтилляционную жидкость для счета импульсов. Можно также определить количество растворенного вещества, включенного в основные биополимеры, обработав клетки на фильтре охлажденным раствором ТХУ (разд. 17.1) и промыв затем водой перед высушиванием. Удобно пользоваться фильтрами, растворяющимися в сцинтилляционной жидкости или в растворителе, смешиваемом с этой жидкостью. Подробно об этом можно прочитать в проспектах фирм или статьях по сцинтилляционному счету.

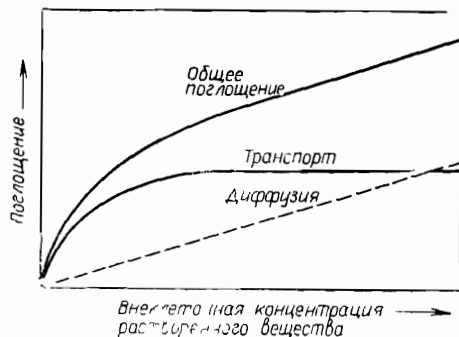
Мембранные фильтры могут связывать изучаемые растворенные вещества, особенно ионизованные, и тогда нужно вносить соответствующую поправку. Степень связывания можно установить, пропустив через фильтр часть испытуемого раствора без клеток, промыв его так, как если бы в нем находились клетки, и определив количество растворенного вещества, задержанного фильтром.

19.2.2. Выражение результатов

Поглощение или выход веществ обычно выражают в пересчете на единицу веса или объема клеток или объема клеточной воды. Результаты исследования транспортных процессов можно также относить к одной клетке, что позволяет сравнивать способность различных клеток к транспорту. Чаще всего пользуются пересчетом на клеточную воду.

Полезно также определить соотношение концентраций испытуемого растворенного вещества внутри клетки и в суспендирующей среде, чтобы выяснить, имел ли место концентрирующий транспорт.

Рис. 19.2. Графическая оценка вклада диффузии в общее поглощение растворенного вещества бактериальными клетками. Поглощение, обусловленное транспортом, равно разности между общим и пассивным поглощением. Его можно измерять либо скоростью процесса, либо общим количеством поглощенного вещества.



При использовании растворенных веществ с радиоактивной меткой весьма желательно переводить результаты счета импульсов в молярные единицы.

Транспортные процессы обычно рассматривают как подклассы реакций, катализируемых ферментами, поэтому здесь применимы принципы и методы изучения ферментативной кинетики. Например, график двойных обратных координат Лайнуивера — Бэрка, отражающий зависимость величины, обратной скорости транспорта, от величины, обратной концентрации растворенного вещества, часто представляют собой прямые линии, позволяющие вычислить значения K_m (константы Михаэлиса) и V_{max} (максимальной скорости). Конкретный пример можно найти в работе Эймса [1]. Можно также построить кривые Эди—Хофсти, отражающие отношение скорости транспорта к скорости, деленной на концентрацию субстрата. Затруднения, возникающие при исследовании кинетики ферментов, встречаются и при изучении транспорта.

Нередко у клеток имеется не одна транспортная система для данного растворенного вещества. Например, многие бактерии обладают высокоаффинной транспортной системой, весьма специфичной для какой-то одной ароматической аминокислоты, а также намного менее специфичной низкоаффинной системой. Методы изучения активности таких множественных систем описаны Эймсом [1].

Многие растворенные вещества могут проникать в клетки как пассивно, путем диффузии, так и в резуль-

тате активного транспорта. При высоких концентрациях субстрата диффузионные процессы обычно не приводят к насыщению; их вклад можно оценить по графику типа представленного на рис. 19.2. Если клетки интактны, процесс диффузии может включать диффузию растворенного вещества в воду клеточной стенки [29], которая у таких организмов, как *Micrococcus lysodeikticus* (*M. luteus*), может составлять около 50% объема клетки.

19.2.3. Общие замечания

Главное преимущество использования разбавленных клеточных суспензий — легкость получения данных по кинетике. Кроме того, в таких суспензиях легче контролировать pO_2 , pH, ионную силу и т. п., а также поддерживать почти постоянную концентрацию растворенного вещества в суспендирующей среде.

Однако этот подход не лишен недостатков. К ним относятся трудности, связанные с выходом растворенного вещества из клеток во время первичного суспендирования или промывания; необходимость определить поглощение или потери растворенного вещества путем измерения его внутриклеточной, а не внеклеточной концентрации; и наконец, то, что в разбавленных суспензиях клетки могут быть весьма чувствительны к изменениям условий среды.

19.3. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

19.3.1. Протонодвижущая сила

Протонодвижущую силу считают одним из основных средств преобразования и переноса энергии в биологических системах [31]. Ее определяют как

$$\Delta p = \Delta \psi - 2,3 \frac{RT}{F} (\Delta pH),$$

где Δp — протонодвижущая сила, $\Delta \psi$ — мембранный потенциал, R — газовая постоянная, T — температура по Кельвину, F — число Фарадея и ΔpH — разность pH внутри и вне клетки. При температуре около 25°C ве-

личина $2,3 RT/F$ (часто обозначаемая z) составляет ~ 59 мВ. Таким образом, для определения Δp необходимо независимо определить $\Delta\psi$ и ΔpH .

Методы определения $\Delta\psi$ обычно включают в себя оценку распределения какого-либо иона, который свободно проходит через клеточную мембрану. Например, Харольд и Альтендорф [16] предложили использовать для вычисления $\Delta\psi$ распределение хлорид-иона. Величина $\Delta\psi$ в этом случае равна

$$2,3RT/F [\log (Cl_{\text{внешн}})/(Cl_{\text{внутр}})],$$

где $(Cl_{\text{внешн}})$ и $(Cl_{\text{внутр}})$ — концентрации хлорид-иона вне и внутри клетки. Эти концентрации можно определять с помощью метода занимаемого пространства или его вариантов. В действительности следовало бы вместо концентраций хлорида использовать его активность, но определить коэффициент активности хлорида внутри клетки невозможно; он, вероятно, лишь ненамного ниже 1,0, так что активность и концентрация не сильно различаются. Активность хлорида можно определить с помощью хлоридного электрода (Orion Research. Inc., Cambridge, Mass.), а концентрацию — химическим методом [40].

Харольд и Альтендорф [16] указывают, что хороший индикатор $\Delta\psi$ должен «быстро диффундировать через мембрану... быть полностью диссоциированным при физиологических значениях pH, не нарушать процессов метаболизма и не подвергаться транслокации системами биологического транспорта». Этим требованиям может удовлетворять K^+ в клетках, обработанных 1—10 мкМ валиномицином с целью сделать мембрану проницаемой для этого иона. Поскольку мембранный потенциал у бактериальных клеток обычно составляет около 180 мВ с отрицательным полюсом внутри, концентрация калия в цитоплазме клеток, обработанных валиномицином, примерно в 20 раз больше, чем в суспендирующей среде. Концентрацию калия можно определить с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии, пламенной фотометрии или — менее точно — ионселективного электрода (разд. 16.2.2). Поглощение K^+ измеряют методом занимаемого объема (или используют одну из его модификаций), а концентрацию вычисляют, исходя из

числа молей K^+ , поглощаемых на единицу объема клеточной воды.

Величину $\Delta\psi$ можно также оценить по распределению проникающих органических катионов или с помощью флуоресцентных красителей. Подробно это описано в статье Мэлони и др. [3]. В качестве проникающего аниона широко применяется тиоцианат, особенно с тех пор как он стал доступен в форме, меченной ^{14}C ; пример описан в статье Соргато и др. [42].

Для определения ΔpH используют слабую кислоту или основание, которые могут проникать в клетку. Выбранное соединение должно диссоциировать при физиологических значениях pH так, чтобы его распределение между клеткой и внеклеточной средой зависело от разности pH обеих фаз. Клеточная мембрана должна быть проницаемой для недиссоциировавшей формы и непроницаемой для ионизированной формы. Для определения ΔpH обычно используют ацетат, диметилсульфоксид, метиламин и салицилат. Рассмотрим уравнение Гендерсона — Хассельбаха для слабой кислоты. Пусть A — анионная форма, HA — недиссоциировавшая форма, а индексы i и o означают концентрацию соответственно внутри и вне клетки. Тогда

$$pH_i = pK_i + \log[A_i]/[HA_i];$$

$$pH_o = pK_o + \log[A_o]/[HA_o].$$

Обычно считают, что $pK_i = pK_o$, и поскольку мембрана проницаема для недиссоциированной формы, то $[HA_i] = [HA_o]$. Следовательно,

$$\begin{aligned} pH_i - pH_o &= \log[A_i]/[HA_o] - \log[A_o]/[HA_o] = \\ &= \log[A_i]/[HA_i] + \log[HA_o]/[A_o] = \\ &= \log \{ [A_i]/[HA_i] \times [HA_o]/[A_o] \}, \end{aligned}$$

$$\Delta pH = \log [A_i]/[A_o].$$

Значение ΔpH можно, таким образом, оценить по распределению, например, ацетата между клетками и суспендирующей средой с помощью описанной выше методики анализа проницаемости. Из наружной концентрации ацетата и pH можно вычислить наружную концентрацию HA , равную внутренней. Внутренняя концентрация A равна разности между общей внутренней

концентрацией ацетата и концентрацией НА. Зная соотношение $[A_i]/[HA_i]$ и значение pK_i , можно найти внутриклеточный рН с помощью уравнения Гендерсона—Хассельбаха.

Метод занимаемого объема позволяет также определить поглощение веществ — индикаторов рН. Кроме того, можно применять методы, не требующие больших количеств клеток, если для определения нецитоплазматической воды используется какое-нибудь не проникающее в клетку соединение. Например, в статье Мэлони и др. [3] на стр. 29 приводится пример определения нецитоплазматической воды в суспензии клеток *Streptococcus lactis* с помощью ^3H -сорбитола с использованием ^{14}C -диметилсульфоксида как индикатора рН. Следует помнить, что определение ΔpH и $\Delta \psi$ в значительной мере опирается на расчеты и что существуют трудности, связанные со специфическим и неспецифическим связыванием заряженных частиц биополимерами. Однако часто важно бывает узнать не абсолютные значения ΔpH или $\Delta \psi$, а их изменения.

Рамос и сотр. [35, 36] разработали и подробно описали метод проточного диализа, не требующий разделения клеток и суспендирующей среды. Этот метод особенно полезен при исследовании мембранных везикул.

В последние годы разработаны методики [33] для определения внутриклеточного рН у бактерий с помощью ядерного магнитного резонанса. Можно также определять pH_i , используя флуоресцентные красители, такие, как пирамин [20]. Зная pH_i , легко определить pH_o с помощью стеклянного электрода и затем вычислить ΔpH .

19.3.2. Осмотически чувствительные клетки

Поглощение клеткой растворенного вещества приводит к снижению активности воды внутри клетки и последующему притоку воды извне, в результате чего клетка набухает. Биологические мембраны хорошо пропускают воду, и набухание происходит чрезвычайно быстро. Например, Мэттс и Ноулз [30] методом остановленной струи установили, что осмотический выход воды из

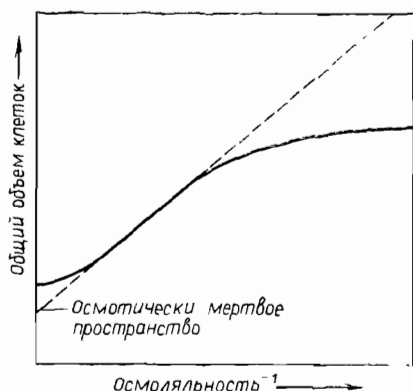


Рис. 19.3. Осмотические изменения объема бактериальных клеток. Прерывистая линия — идеальное поведение в соответствии с уравнением Вант-Гоффа — Бойля. Сплошная линия — реальное поведение.

клеток *E. coli*, помещенных в 0,4 М раствор $MgCl_2$, завершается при 37 °С за 50 мс. Поскольку движение воды столь стремительно, скорость набухания, сопровождающего поглощение растворенного вещества, можно связать непосредственно со скоростью транспорта. Нужно, однако, подходить к этому с некоторой осторожностью, особенно в отношении тех бактериальных клеток, стенки которых достаточно эластичны, чтобы сопротивляться набуханию. (Да, именно эластичность, а не жесткость, как обычно предполагают, противостоит набуханию. Физические свойства бактериальных клеточных стенок рассматриваются в обзоре Роджерса [38].)

Набухание и сжатие идеального осмометра можно предсказать с помощью уравнения Вант-Гоффа—Бойля

$$V - b = a/\Pi,$$

где V — общий объем клетки, b — так называемый осмотически мертвый объем (который обычно приблизительно равен вычисленному объему сухого вещества клетки), a — константа (число осмолей в клетке) и Π — осмоляльность суспендирующей среды. График зависимости V от $1/\Pi$ для идеального осмометра представляет собой прямую линию с пересечением оси y в точке b и наклоном a , тогда как действительное поведение бактериальных клеток описывается кривой (рис. 19.3). Очевидно, что бактерии не являются идеальными осмометрами.

Реакция на изменение осмоса заметно снижается в средах с высокой осмоляльностью, и экспериментально определяемое значение b можно получить только путем экстраполяции. Причины аномального поведения в концентрированных средах неизвестны. Оно может быть обусловлено связыванием воды и загустением цитоплазмы или же снижением проницаемости для воды.

В разбавленных средах бактериальные клетки резистентны к осмотическому набуханию в основном благодаря эластичности их стенок. В концентрированных же средах они подвергаются плазмолизу, т. е. протопласт сжимается так, что мембрана отстает от стенки и между стенкой и мембраной протопласта образуются плазмолизные вакуоли. Их часто можно увидеть под микроскопом, особенно у грамтрицательных бактерий. Но даже если они не видны под микроскопом, их присутствие можно выявить путем измерения проницаемости. Можно, например, определить общий объем как пространство, непроницаемое для декстрана. Объем протопласта примерно равен объему, непроницаемому для рафинозы в условиях, когда рафиноза не проникает через мембрану протопласта. Тогда суммарный объем воды в клеточной стенке и плазмолизных вакуолях равен разности между объемами, непроницаемыми для декстрана и для рафинозы. Объем, занимаемый водой в клеточной стенке, можно оценить по величине объема, доступного для рафинозы, в набухших, неплазмолизированных клетках.

Если плазмолизированные клетки вновь поместить в более разбавленную среду, то вода поступит в протопласт через водопроницаемую мембрану и протопласт набухнет; он займет пространство, ранее занятое плазмолизными вакуолями, и оптическая плотность суспензии возрастет. Между объемом протопласта и величиной, обратной оптической плотности, существует прямая зависимость [27]. Когда протопласт только начинает набухать, сопротивление набуханию незначительно и процесс протекает почти идеально, т. е. подчиняется уравнению Вант-Гоффа—Бойля. Но когда протопласт смыкается с клеточной стенкой, ее эластичность препятствует дальнейшему набуханию, и это приводит к существенному отклонению от идеального процесса. Те-

перь при поглощении воды возрастает объем не только протопласта, но и всей клетки, так что клеточная стенка растягивается.

Излом кривой зависимости V от $1/P$ происходит в так называемой точке начала плазмолиза. Дальнейшее снижение осмоляльности среды приводит к возникновению и нарастанию тургорного давления. Предполагается, что осмоляльность среды в точке начала плазмолиза приблизительно равна внутренней осмоляльности клетки (это состояние для растительных клеток рассматривал Стеделман [6]). Внутреннюю осмоляльность можно также определить, зная константу a (число идеальных молярных эквивалентов внутри клетки) и объем протопласта. Результаты, полученные двумя этими способами, обычно достаточно хорошо согласуются.

Эластичность клеточной стенки не влияет на набухание выделенных протопластов, часто используемых в работах по транспорту, и, по-видимому, мало влияет на сферопласты, у которых сохраняются остатки стенок. Если, однако, протопласты заставить набухать медленно, так чтобы их мембраны не разрывались, мембрана может стать упругой и степень набухания нельзя будет предсказать с помощью уравнения Вант-Гоффа — Бойля [27].

Как уже упоминалось, величина, обратная оптической плотности, может служить показателем клеточного объема и, следовательно, поглощения растворенного вещества, хотя, конечно, следует всегда помнить, что на самом деле в таких опытах наблюдают за перемещением воды.

Важно также знать, что оптическая плотность зависит от разницы показателей преломления клетки и суспендирующей среды и что может потребоваться внесение поправок на изменение показателя преломления среды в результате повышения или понижения концентрации растворенного вещества. В идеале желательно было бы иметь суспендирующую среду с изменяющейся концентрацией растворенного вещества, но постоянным показателем преломления. Нередко при изучении поглощения растворенных веществ наружная концентрация изменяется незначительно, и поэтому поправок не требуется. Однако при изучении изменений осмотического

объема концентрации, как правило, сильно варьируют. У солевых растворов показатель преломления при изменениях концентрации растворенных веществ изменяется меньше, чем у растворов сахаров. Однако в обоих случаях может потребоваться поправка величины мутности на изменение показателя преломления. Целесообразно иметь растворы полимерных декстранов, сильно различающиеся по показателю преломления, но с низкой осмоляльностью. Тогда можно было бы, например, приготовить концентрированный раствор сахарозы с высоким показателем преломления и высокой осмоляльностью и раствор декстрана Т2000 с таким же показателем преломления, но почти нулевой осмоляльностью. Эти два раствора можно было бы смешивать в различных пропорциях, получая растворы с различной осмоляльностью, но одинаковым показателем преломления. Приращение показателя преломления (α) для углеводов равно 0,00143; показатель преломления n раствора углевода можно вычислить по формуле $n = n_s + \alpha C$, где n_s — показатель преломления воды (1,33252 при 25°C), а C — концентрация углевода в граммах на 100 мл раствора. Можно, конечно, определять показатели преломления растворов и с помощью рефрактометра.

Использование плазмолизированных клеток при изучении транспортных процессов подробно описали Мэлони и др. [3]. Применение протопластов описано Абрамсом [7].

19.3.3. Неметаболизируемые аналоги для раздельного изучения транспорта и метаболизма

Во многих случаях при изучении транспорта желательно отделить собственно транспортный процесс от последующего метаболизма, особенно в тех случаях, когда нужно продемонстрировать концентрирующее поглощение. В отношении фосфотрансферазных систем полная диссоциация двух процессов невозможна. Существуют три основных способа отделения транспорта от метаболизма: 1) с помощью неметаболизируемых, но транспортируемых аналогов; 2) путем использования мутантов с заблокированным метаболизмом, но сохраненным

Таблица 19.1. Примеры неметаболизируемых аналогов, используемых для изучения транспорта у бактерий

Метаболизируемый субстрат	Аналоги	Источник данных
Лактоза (β -галактозид)	Тиометилгалактозид Тиодигалактозид Тиофенилгалактозид Изопропилтиогалактозид	[21]
Глюкоза	2-Дезоксиглюкоза α -Метилглюкозид	[39] [44]
Глицин Аланин Фенилаланин K^+	α -Аминоизобутират <i>n</i> -Фторфенилаланин Rb^+	[29, 43] [28] [5, 37]

транспортом и 3) с помощью мембранных везикул, не содержащих цитоплазматических ферментов.

Список некоторых часто используемых аналогов приведен (с указанием соответствующих литературных источников) в табл. 19.1.

19.3.4. Мутанты с блокированным метаболизмом

Отбор мутантов для изучения транспорта гистидина у *Salmonella typhimurium* подробно описан Эймсом [9]. Широко используются для этой цели мутанты *zy⁺ E. coli*, лишенные β -галактозидазы, но сохраняющие систему транспорта для β -галактозидов; эти мутантные штаммы можно получить в коллекциях генетически маркированных культур (разд. 13.10).

19.3.5. Мембранные везикулы

Использование мембранных везикул, предложенное Кабаком и Штадтманом [19], становится все более популярным. Обзор их применения при изучении транспорта был сделан недавно Конингсом [23].

Первый этап получения везикул обычно состоит в превращении изучаемых бактерий в осмотически чувствительные формы; последние подвергают лизису в условиях, при которых возможно образование везикул. Сфе-

ропласты грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, можно получить, обрабатывая клетки лизоцимом и ЭДТА [18]; при такой обработке внешняя мембрана клеточной стенки остается на сферопласте. Протопласты грамположительных бактерий часто можно полностью освободить от структур клеточной стенки путем обработки клеток муралитическим ферментом. Для *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* и *M. lysodeikticus* использовали лизоцим, для *Staphylococcus aureus* — лизостафин.

Кобаяси и др. [22] выделили везикулы из штамма ATCC 9790 *S. faecalis* с помощью методики, которая достаточно иллюстративна. Они суспендировали клетки в осмотически стабилизирующем растворе, содержащем 500 мМ глицилглицин и 2 мМ $MgSO_4$ (pH 7,2), затем добавляли 0,5 мг лизоцима на 1 мл и инкубировали 1 ч при 37°C (протопласты можно также стабилизировать сахарозой вместо глицилглицина). Суспензию протопластов центрифугировали, ресуспендировали в гипотоническом растворе, содержащем 50 мМ трис-малеат (pH 7,4), 250 мМ сахарозу, и 5 мМ $MgSO_4$, и обрабатывали дезоксирибонуклеазой I, для активации которой требуются ионы магния. Суспензию охлаждали, гомогенизировали с помощью гомогенизатора для тканей и центрифугировали 10 мин при 5000 g для осаждения мембран. Мембраны ресуспендировали в трис-малеатном буфере с сахарозой и $MgSO_4$, а затем пропускали через пресс Френча (700 кг/см²). Полученную суспензию дважды центрифугировали: при 27 000 g для удаления крупных частиц и при 48 000 g в течение 90 мин для осаждения везикул.

Возможны различные варианты этой методики, и для выбора оптимальной процедуры применительно к конкретному организму нужны предварительные опыты. Конингс и др. [24] описали сокращенную одноэтапную методику для грамположительных бактерий, в особенности для *B. subtilis*.

Получаемые препараты обычно неоднородны по размерам везикул, а препарат Кобаяси и др. [22] содержал как нормальные, так и вывернутые везикулы, что видно на электронных микрофотографиях при использовании метода замораживания — скалывания. Из *E. coli*

можно получить препараты, содержащие только «нормальные» («невывернутые») везикулы. Например, Кабак [18] описал методику, включающую осмотический лизис, без использования прессы Френча; при его использовании везикулы *E. coli* могут содержать в основном «вывернутые» формы, которые накапливают Ca^{2+} , вместо того чтобы экскретировать его, и не способны поглощать такие вещества, как пролин [8].

Непрерывность мембраны везикул лучше всего можно проверить, определив степень набухания или сжатия последних при изменении осмоляльности суспендирующей среды. Для этого можно использовать методы, описанные в предыдущем разделе (разд. 19.3.2), включая определение изменений светорассеяния. Функциональное состояние везикул испытывают, определяя их способность к транспорту растворенных веществ, например пролина.

19.4. ЛИТЕРАТУРА

19.4.1. Общая литература

1. Ames G.-F. L. Two methods for the assay of amino acid transport. *Methods Enzymol.*, **32**, 843—849 (1974).
В статье подробно описываются методы измерения поглощения гистидина *S. typhimurium*. Описаны методы, применимые к растущим, голодающим или нерастущим клеткам; они могут также применяться для изучения многих других систем транспорта у бактерий.
2. Lamanna C., Mallette M. F., Zimmerman L. Basic bacteriology, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1973.
Стандартный учебник, в котором рассмотрены вопросы осмоса и проницаемости с методической точки зрения (разделы гл. 6).
3. Maloney P. C., Kashket E. R., Wilson T. H. Methods for studying transport in bacteria. *Methods Membrane Biol.*, **5**, 1—49 (1975).
Блестящий обзор основных методов изучения систем транспорта у бактерий; представлены данные по конкретным культурам, обсуждаются многие важные технические детали. В основном рассматривается транспорт лактозы, однако описанные методы представляют общий интерес.
4. Rosen B. P. Bacterial transport, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.
Книга по вопросам транспорта; вступительная глава М. Футаи посвящена методологии этой проблемы; многие последующие главы содержат описание методов определения.
5. Silver S., Pattacharyya P. Cations, antibiotics, and membranes, *Methods Enzymol.*, **32**, 881—893 (1974).

В статье описаны методы определения поглощения катионов и приведена таблица изотопов, имеющих практическое значение.

6. *Stadelmann E. J.* Evaluation of turgidity, plasmolysis, and deplasmolysis of plant cells, *Methods Cell Physiol.*, **2**, 144—216 (1966). Предметом статьи являются растительные клетки, но большая часть представленного материала применима к бактериальным клеткам, которые также обычно имеют стенки. Особенно ценно описание плазмолиза и тургора.

19.4.2. Специальная литература

7. *Abrams A. J.* *Biol. Chem.*, **235**, 1281—1285 (1960).
8. *Altendorf K. H., Staehelin L. A.* *J. Bacteriol.*, **117**, 888—899 (1974).
9. *Ames G.-F. L.* *Methods Enzymol.*, **32**, 849—856 (1974).
10. *Arnold W. N., Lacy J. S. J.* *Bacteriol.*, **131**, 564—571 (1977).
11. *Conway E. J., Downey M.* *Biochem. J.*, **47**, 347—355 (1950).
12. *Damadian R. V.* *Crit. Rev. Microbiol.*, **2**, 377—422 (1973).
13. *Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.* *Anal. Chem.*, **28**, 350—356 (1956).
14. *Epstein W., Schultz S. G. J.* *Gen. Physiol.*, **49**, 221—224 (1965).
15. *Hamilton W. A.* In: B. A. Haddock and B. A. Hamilton (ed.), *Microbial energetics*, p. 185—216, Cambridge University Press, New York, 1977.
16. *Harold F. M., Altendorf K.* *Curr. Top. Membr. Transp.*, **5**, 1—50 (1974).
17. *Hurwitz C., Braun C. B., Peabody R. A.*, *J. Bacteriol.*, **90**, 1692—1695 (1965).
18. *Kaback H. R.* *Methods Enzymol.*, **22**, 99—120 (1971).
19. *Kaback H. R., Stadtman E. R.* *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **55**, 920—927 (1966).
20. *Kanos K., Fendler J. H.* *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 289—299 (1978).
21. *Kepes A.* *Curr. Top. Membr. Transp.*, **1**, 101—134 (1970).
22. *Kobayashi H., Van Brunt J., Harold F. M.* *J. Biol. Chem.*, **253**, 2085—2092 (1978).
23. *Konings W. N.* *Adv. Microb. Physiol.*, **15**, 175—251 (1977).
24. *Konings W. N., Bisschop A., Veenhuis M., Vermeulen C. A.* *J. Bacteriol.*, **116**, 1456—1465 (1973).
25. *Levin B. C., Freese E. J.* *Environ. Sci. Health, Part C, Environ. Health Sci.*, **13**, 1—21 (1978).
26. *MacDonald R. E., Gerhardt P.* *Can. J. Microbiol.*, **4**, 109—124 (1958).
27. *Marquis R. E.* *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 323—331 (1967).
28. *Marquis R. E.* *Handb. Exp. Pharmacol.*, **XX/2**, 166—192, 1970.
29. *Marquis R. E., Gerhardt P.*, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3361—3371 (1964).
30. *Matts T. C., Knowles C. J.* *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 583—587 (1971).
31. *Mitchell P.* *Biol. Rev.*, **41**, 445—502 (1966).
32. *Mitchell P., Moyle J. J.* *Gen. Microbiol.*, **20**, 434—441 (1959).

33. *Ogawa S., Shulman R. G., Glynn P., Yamane T., Navon G.* Biochim. Biophys. Acta, **502**, 45—50 (1978).
34. *Postma P. W., Roseman S.* Biochim. Biophys. Acta, **457**, 213—257 (1976).
35. *Ramos S., Kaback H. R.* Biochemistry, **16**, 848—854 (1977).
36. *Ramos S., Schuldiner S., Kaback H. P.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**, 1892—1896 (1976).
37. *Rhoads D. B., Woo A., Epstein W.* Biochim. Biophys. Acta, **469**, 45—51 (1977).
38. *Rogers H. J.* Adv. Microb. Physiol., **19**, 1—62 (1979).
39. *Romano A. H., Eberhard S. J., Dingle S. L., McDowell T. D. J.* Bacteriol., **104**, 808—813 (1970).
40. *Schales O., Schales S. S. J.* Biol. Chem., **140**, 879—884 (1941).
41. *Scherrer R., Gerhardt P. J.* Bacteriol., **107**, 718—735 (1971).
42. *Sorgato M. C., Ferguson S. J., Kell D. B., John P.* Biochem. J., **174**, 237—256 (1978).
43. *Thompson J., MacLeod R. A. J.* Biol. Chem., **248**, 7107—7111 (1973).
44. *Winkler H. H. J.* Bacteriol., **106**, 362—368 (1971).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть III

ГЕНЕТИКА

Введение. <i>Ю. Нестер</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	5
Литература (7)	
Глава 13. Мутации. <i>Б. Кэрлтон, Б. Браун</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	8
13.1. Выбор нужного мутанта (9). 13.2 Выбор мутагена (12). 13.3. Экспрессия мутаций (26). 13.4. Обогащение мутантными клетками (26). 13.5. Прямое выявление мутантов (28). 13.6. Непрямое выявление мутаций (35). 13.7. Изучение свойств мутантов (41). 13.8. Специальные приложения (43). 13.9. Рецепты сред (55). 13.10. Источники штаммов и специальных материалов (60). 13.11. Литература (62).	
Глава 14. Перенос генов. <i>Р. Кёртис</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	65
14.1. Трансформация (65). 14.2. Трансдукция (80). 14.3. Конъюгация (101). 14.4. Среды и штаммы (117). 14.5. Литература (125).	
Глава 15. Плазмиды. <i>Дж. Кросса, С. Фалкоу</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	128
15.1. Выделение плазмидной ДНК (130). 15.2. Выделение плазмидной ДНК с большой молекулярной массой (136). 15.3. Изучение свойств плазмидной ДНК (139). 15.4. Литература (164).	

Часть IV

МЕТАБОЛИЗМ

Введение. <i>В. Вуд</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	166
Глава 16. Физические методы. <i>В. Вуд</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	167
16.1. Фотометрия (167). 16.2. Ионселективные электроды (181). 16.3. Хроматография (191). 16.4. Радиоактивность (233). 16.5. Гель-электрофорез (258). 16.6. Манометрия (278). 16.7. Литература (279).	

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 17. Химический состав бактериальной клетки. <i>Р. Хансон, Дж. Филлипс</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	283
17.1. Основные химические компоненты: фракционирование и определение радиоактивности (283). 17.2. Углеводы (292). 17.3. Липиды (308). 17.4. Полимеры клеточной стенки (325). 17.5. Нуклеиновые кислоты (334). 17.6. Азотсодержащие соединения (340). 17.7. Органические кислоты и спирты (366). 17.8. Элементы (367). 17.9. Литература (369).	
Глава 18. Ферментативная активность. <i>В. Доброгоч</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	374
18.1. Подготовка клеток (376). 18.2. Измерение активности (386). 18.3. Регуляция активности (406). 18.4. Регуляция синтеза (413). 18.5. Анализ путей метаболизма (421). 18.6. Литература (437).	
Глава 19. Проницаемость и транспорт. <i>Р. Маркис</i> (Перевод Х. С. Андреевой)	440
19.1. Проницаемость (441). 19.2. Транспорт (450). 19.3. Специальные методы (456). 19.4. Литература (466).	

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги,
ее оформлении, качестве перевода
и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

МЕТОДЫ
ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ
Том 2

Научный редактор Т. И. Пономарева
Мл. научн. редактор Р. Ф. Куликова
Художник А. В. Шипов
Технический редактор Т. Д. Папасюк
Корректор И. И. Дериколенко

ИБ № 3311

Сдано в набор 25.07.83. Подписано к печати 09.12.83.
Формат 84×108¹/₃₂. Бумага типографская № 1. Гарнитура
литературная. Печать высокая. Объем 7,38 бум. л.
Усл. печ. л. 24,78. Усл. кр.-отт. 24,78. Уч.-изд. л. 25,03.
Изд. № 4/2552. Тираж 11300 экз. Зак. 1551
Цена 2 р. 10 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». 129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при
Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нага-
тинская ул., д. 1.