

УДК 59 ББК 28.6/ Н-90

Определение содержания углеводов, липидов и белков в крови, тканях и митохондриях животных (на примере крыс)**Нурдинов Ш.Ш., Дороев А.А. - ЖАГУ**

Содержание **глюкозы** в сыворотке крови и тканях определяют орта-толуидиновым методом [Меньшиков и др., 1987]. Количество глюкозы в ткани определяют в безбелковом фильтрате. Осаждение белков осуществляли по методу Прохорова, [1982]. Ткань обрабатывают предварительно охлажденной смесью воды и бария из расчета 15мл H_2O и 2мл 0,3% раствора $Ba(OH)_2$ на 1г ткани. Спустя 10-15мин к смеси, находящейся на льду, медленно прибавляют 2мл 5% раствора (на 1г ткани). Через 15 мин центрифугируют при 3000g в течение 10 мин. Полученный супернатант фильтруют через вату и используют для определения количества глюкозы.

Определение содержания лактата. Содержание лактата в сыворотке крови и тканях определяют по методу М.И. Прохорова [1982]. Навеску замороженной в жидком азоте и растертой ткани или 1мл сыворотки крови помещают центрифужные пробирки, находящиеся на льду, куда предварительно наливали по 1мл $HClO_4$ (6%), после чего добавляют 0,25мл $HClO_4$ и оставляют на 10 мин во льду. Осадок белка получают центрифугированием в течение 5 мин при 3000g. Для удаления избытка $HClO_4$ к надосадочной жидкости добавляют 5М K_2CO_3 из расчета 0.05мл на 1мл пробы. Осадок перхлората калия отделяют фильтрованием. Для энзиматической реакции используют 0.2мл нейтрализованного экстракта. Количество соляной кислоты (лактата) выражают в мкмолях на 1г ткани или на 1мл сыворотки.

Содержание **пирувата** в сыворотке крови и тканях определяют по методу М.И.Прохорова [1982]. Навеску замороженной в жидком азоте и растертой ткани или 1мл сыворотки крови помещают в центрифужную пробирку, стоящую во льду, куда предварительно наливают 2,7мл 0,6Н $HClO_4$ и оставляют во льду на 15 мин для более полной экстракции пирувата. Затем центрифугируют в течение 10 мин при 3000g. Безбелковый супернатант переносят в центрифужную пробирку и удаляют избыток $HClO_4$ добавлением 0.2мл 5М раствора K_2CO_3 . Осадок перхлората калия отделяют фильтрованием. Нейтрализованный безбелковый экстракт используют для проведения ферментативной реакции. Количество пировиноградной кислоты выражают в мкмолях на 1г ткани или на 1 мл сыворотки.

Содержание **гликогена** в печеночной ткани определяют по методу М.И. Прохорова [1982]. Навеску ткани помещали в пробирку с 1мл 30% раствора КОН и добавляют 60% КОН в количестве соответствующем навеске. Пробы ставили в кипящую водяную баню на 1 час. К полученному щелочному гемолизату после охлаждения добавляют 1,2 объема спирта, смесь ставили в холодильник на ночь для лучшего выпадания осадка гликогена. Осадок гликогена после центрифугирования в течение 30 мин при 4000g подвергали последовательной промывке 70, 80 и 90% спиртом с последующим центрифугированием. Промытый осадок осторожно подсушивают на водяной бане. Полученные осадки гликогена растворяют в горячей воде и к раствору добавляли 2 мл H_2SO_4 . Пробы гидролизовали в кипящей водяной бане в течение 2,5 часа. Гидролизат последовательно нейтрализуют 5Н NaOH до pH 7.8-8.0. В гидролизате определяют количество глюкозы ортотолуидиновым методом. Количество гликогена в пробах выражали в мг %.

Для определения интенсивности **гликолиза** в печени был использован метод А.Е.Александровой и А.В.Говоровой [1977]. После декапитации крысы быстро извлекали печень и в холодильной камере (0°C) перфузировали ледяным 0.9% раствором NaCl.

Среда выделения состояла из 0,25М сахарозы и 0,02М ЭДТА. Исследования проводились в супернатанте, полученным после фракционного осаждения субклеточных структур общепринятым методом. Инкубационная среда содержала (в молях на 1л: калий фосфат– $5 \cdot 10^{-2}$ М, $MgCl_2$ – $7 \cdot 10^{-3}$ М, АТФ – $1 \cdot 10^{-3}$ М, никотинамид – $5 \cdot 10^{-2}$ М, общий объем 1,3мл, содержание белка 2-4мг). Время инкубации 60 мин при 37°C. Ферментативный процесс прекращали добавлением 2,4 Н $HClO_4$. Интенсивность гликолиза выявляли по содержанию лактата, образуемого за время инкубации. Активность гликолиза выражали в мкг лактата мг белка час.

Определение липида. Насыщенные липиды и жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин взаимодействуют после гидролиза серной кислотой с фосфованилиновым реактивом с образованием красного окрашивания [Bligh, Dyer, 1959; Бергельсон и др., 1981]. Ход определения: берутся 3 пробирки: опытная, контрольная и для раствора сравнения. В опытную пробирку наливают 0,02мл сыворотки или гомогената ткани, в пробирку для раствора сравнения 0,02мл эталонного раствора. После этого во все пробирки добавляют по 1,50 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают и нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. Затем пробирки охлаждают в токе холодной воды. Далее в центрифужные пробирки наливают 0,10мл гидролизата и 1,50 мл раствора ванилина (ванилин 10ммоль/л, кислота ортофосфорная 11,5ммоль /л). Содержимое пробирок перемешивают и оставляют стоять 50мин при комнатной температуре и не позднее, чем через 60 мин, измеряют оптическую плотность пробы и раствора сравнения против контрольного раствора. Определения производят на фотоэлектроколориметре, ширина кюветы 1см.

Общее содержание липидов в экстракте определяют по фосфору после сжигания хлорной кислотой, используя реактив Васковского [Vaskovsky et al., 1975]. К Митохондрии, тканям и крови после отбора аликвот на белок, добавляли смесь хлороформ-метанола так, чтобы соотношение хлороформ-метанол-вода составляло 1:2:0,8 в объеме 2мл. Затем фильтруют в мерные пробирки с притертой пробкой объемом 20мл. Осадок на фильтре трижды промывали смесью хлороформ-метанол (2:1) по 1мл и горячим метанолом – 1мл. Обработка горячим метанолом способствует лучшему извлечению лизофосфолипидов, кислых фосфолипидов. К фильтрату добавляли 2,8мл 0,2% раствора хлористого кальция до образования двух фаз: хлороформенной и водно-метаноловой. После четкого расслоения верхнюю фазу отсасывают. Оставшиеся в верхней фазе липиды экстрагируют в 4мл хлороформа. Объединенный хлороформенный экстракт трижды промывали смесью (по 1мл) хлороформ-метанола – 0,02% $CaCl_2$ (2:48:47). После отмывания отбирают по 1/10 от имеющегося объема для определения общих липидов и липидного фосфора [Vaskovsky et al., 1975]. Оставшийся липидный экстракт упаривают досуха в токе азота и растворяют в 5-10мкл хлороформ-метанола (2:1).

Для разделения фракций липидов и фосфолипидов используют проточно горизонтальную хроматографию [Каргаполов, 1981]. Силикагель марки «КСК» измельчают и отбирают фракцию сорбента с размером частиц от 0,032мм (32мк) до 0,045мм (45мк). Полученные фракции после очистки наносят на пластинки методом осаждения и высушивают на воздухе. Перед использованием с помощью специального приспособления пластинки с силикагелем разделялись на 16-18 отдельных дорожек шириной 4-5мм. Исследуемый липидный материал в количестве 10-40мкг в объеме 2-5мкл наносят одновременно на две пластинки, помещенные в плоские стеклянные камеры для проточной хроматографии. В первой камере проводилось фракционирование общих липидов в системе гептан-этилацетат-эфир (12:3:0,6), во второй – фосфолипидов в системе хлороформ-метанол-7Н аммиак (12,4:4,6:1). Время хроматографии общих липидов составляло 40-50мин.

Хроматограммы после высушивания сжигались без опрыскивания над хромовой смесью в муфельной печи при температуре 200°C в течение 30 мин. Фосфолипиды тканей и митохондрии идентифицировали при помощи специфических обнаружителей

[Бергальсон и др., 1981]: нингидринового реактива на аминоксодержащие фосфолипиды, реактива Драгендорфа на холинсодержащие фосфолипиды. Для обнаружения глицерина и инозита применяли аммоний или нитрат серебра. Присутствие сфинголипидов обнаруживалось с помощью смеси серной и уксусной кислоты (1:1 по объему).

Фосфолипиды крови, тканей и митохондрии количественно определяют по фосфору. Для этого пластинки проявляли в йодной камере, пятна фосфолипидов обводили тонкой иглой, затем пластинки нагревали для удаления йода 15 мин при 100°C. Силикагель, содержащий фосфолипиды, соскабливали в отдельные стеклянные пробирки, добавляли по 0,2мл хлорной кислоты (72%). Сжигают фосфолипиды при 190-200°C в течение 20мин. После охлаждения добавляли по 1мл реактива Васьковского [Vaskovsky et al., 1975], содержание пробирок интенсивно перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15мин. После охлаждения центрифугировали для отделения силикагеля и спектрофотометрировали при 830нм. Калибровочную кривую строили по стандартному раствору KH_2PO_4 . Чувствительность метода 1-20мкг фосфора в пятне.

Определения белка приготовление реактива Фолина. Собирают установку с обратным холодильником. В колбу для проведения реакции вносят 100г вольфрамата натрия, 20г фосфорномолибденовой кислоты, 50 мл 85 % фосфорной кислоты и 750 мл дистиллированной воды. Колбу с полученной смесью соединяют с установкой и с обратным водяным холодильником. Содержимое колбы подвергают кипячению в течение 10 часов. По истечению этого времени нагреватель отключают, колбу охлаждают и доводят объём реактива до 1 л дистиллированной водой.

Ход определения белка в пробе. Берут 0,05 мл суспензии Митохондрии и добавляют 9,95 мл 0,1 н NaOH (разведённая в 200 раз). Из смеси берут 0,4 мл и добавляют 2,5 мл реактива С, а через 10 мин добавляют ещё 0,25 мл реактива Е (двухкратно разведённый в дистиллированной воде реактив Фолина). Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин в тёмном месте. Количество белка определяют фотоэлектроколориметрически (светофильтер красный) с раствором, содержащим все добавки, кроме белка [Lowry O.H. et al., 1951].