Определение активности Na, K – АТФ-азы в ткани почек

по Скау (Наточик Ю.В., Леонтьев В.Г., Маслова М.Н., 1975)

Необходимые приборы:

- спектрофотометр;
- рефрижераторная центрифуга;
- центрифуга;
- регулируемая водяная баня.

Определение активности Na, K – АТФ-азы в ткани слоев почек проводится в несколько этапов:

1. Подготовка образцов ткани слоёв почек;
2. Определение в исследуемых образцах общей и Mg-зависимой АТФ-аз;
3. Определение неорганического фосфора в образцах ткани слоёв почек, содержащих общую и Mg-зависимую АТФ-азу;
4. Определение содержания белка в гомогенате слоёв ткани почек;
5. Расчёты.

1 ЭТАП

Для сохранения активности Na, K-АТФ-азы почки разделывают послойно на промороженной поверхности. Полученные образцы взвешивают, помещают в холодные ступки и растирают, добавляя уже после этого раствор сахарозы в соотношении 1 к 9, то есть на каждый 1 мг ткани 0,009 мл раствора сахарозы, и ещё раз растирают. Гомогенат тканей в течение 10-15 минут центрифугируют при 1000-2000 об/мин в рефрижераторной центрифуге. Сливают в небольшую пробирку надосадочную жидкость (супернатант) и в закрытом виде ещё раз промораживают в морозильнике.

Для приготовления 100 мл раствора сахарозы необходимо:

- 0,1 М раствор ТРИС (12,114 г до 1,0 л дистиллированной воды) ;
- 8550 мг сахарозы;
- 37 мг ЭДТА;
- 250 мг дезоксихолата натрия (при его отсутствии можно использовать 273,3 мг диоксихолевой кислоты, к которой необходимо добавить 24,2 мг NaOH).

Сахарозу, ЭДТА и дезоксихолат натрия вносят в 100 мл мерную колбу и доводят до метки 0,1 М раствором ТРИСа.

2 ЭТАП

Для определения Na, K – АТФ-азы необходимо проводить исследования в 3-х пробирках:

- в первой определяют суммарную АТФ-азу;
- во второй – Mg-зависимую АТФ-азу;
- третья пробирка является контрольной с трихлоруксусной кислотой.

Раствор для приготовления среды инкубации:

Все растворы готовится на 0,1 М растворе ТРИСа при pH равном 7,4:

- 100 ммоль/мл раствор NaCl (292,5 мг NaCl растворить в 50 мл ТРИС);
- 10 ммоль/мл раствор (I) KCl (37,3 мг KCl растворить в 50 мл ТРИС);
- 110 ммоль/мл раствор (II) KCl (410,3 мг KCl растворить в 50 мл ТРИС);
- 6 ммоль/мл раствор $MgCl_2$ (60,9 мг $MgCl_2$ растворить в 50 мл ТРИС);
- 0,1 ммоль/мл раствор ЭДТА (18,6 мг ЭДТА растворить в 50 мл ТРИС);
- 2 ммоль/мл раствор АТФ (готовится непосредственно перед употреблением, исходя из того, что на одну пробу необходимо 0,2 мл, содержащего 2,49 мг АТФ. Растворяют в растворе ТРИСа, однако при этом может меняться pH. В этом случае доводят pH до 7,4 добавлением ТРИСа).

ПРОБИРКИ		
№1 Суммарная АТФ-аза	№2 Mg-зависимая АТФ-аза	№3 Контроль с ТХУК
0,2 мл NaCl 0,2 мл KCl (1) 0,2 мл ЭДТА 0,2 мл $MgCl_2$ 0,2 мл АТФ 0,2 мл пробы 0,8 мл ТРИС -	- 0,2 мл KCl (2) 0,2 мл ЭДТА 0,2 мл MgCl2 0,2 мл АТФ 0,2 мл пробы 1,0 мл ТРИС -	0,2 мл NaCl 0,2 мл KCl (1) 0,2 мл ЭДТА 0,2 мл $MgCl_2$ 0,2 мл АТФ 0,2 мл пробы 0,8 мл ТРИС 0,4 мл ТХУК
В каждую пробирку добавляют все реагенты строго в приведённой последовательности. Затем пробирки помещают точно на 20 минут в водяную баню при температуре 37,6° С. Для прекращения реакции в 1 и 2 пробирках, не вынимая их из водяной бани, вносят ТХУК.		
0,4 мл ТХУК	0,4 мл ТХУК	-
Исследуемые образцы вынимают из бани, охлаждают и центрифугируют 15 минут при 3500 об/мин. В надосадочной жидкости определяется содержание фосфора по ниже приведённой методике.		

3 ЭТАП

Определение неорганического фосфора ($P_н$)

по Белла-Бригса-Юдилевичу (цит. по Ю.Н.Неменовой, 1972)

Необходимые реактивы:

- 20% раствор трихлоруксусной кислоты;
- 2% раствор свежеприготовленной аскорбиновой кислоты;
- молибденовая смесь: 25,0 г молибденовокислого аммония растворить в 300 мл дистиллированной воды; отдельно к 125 мл дистиллированной воды при-

лить 75 мл концентрированной, химический чистой, серной кислоты и, после её охлаждения, оба раствора смешать;

- основной стандартный раствор с концентрацией фосфора в 0,1 моль/л (1,361г однозамещенной калиевой соли фосфорной кислоты (KH_2PO_4) растворить в 100 мл дистиллированной воды, добавить для большей сохранности 1 мл хлороформа);
- калибровочные стандартные раствора с концентрацией фосфора в 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 и 0,125 ммоль/л готовят из основного стандартного раствора.

К 0,2 мл надосадочной жидкости исследуемых образцов, то есть из каждой пробирки (1-й, 2-й и 3-й) прилить 0,8 мл дистиллированной воды и 0,5 мл трихлоруксусной кислоты, перемешать и в течение 10 минут центрифугировать при 2000 об/мин. После чего, к 1,0 мл супернатанта добавть по 0,2 мл молибденового реактива и аскорбиновой кислоты, а через 5 минут – 1,6 мл дистиллированной воды и спустя 10 минут колориметрировать при длине волны 650-690 нм против контрольной пробы, в которой к 1,0 мл дистиллированной воды добавить в той же последовательности все реактивы. Концентрацию фосфора рассчитать по заранее построенной калибровочной кривой.

4 ЭТАП

Определение белка по Лоури

Содержание белка определяю в гомогенате тканей по ниже приведённой методике.

Необходимые реактивы:

- реактив Фолина;
- реагент А: в 500 мл дистиллированной воды добавить 2 г NaOH и 10 г Na_2CO_3;
- реагент В: к 49 мл дистиллированной воды добавить 1 г сегнетовой соли; отдельно к 49,5 мл дистиллированной воды добавить 0,5 г $CuSO_4*5H_2O$. Перед употреблением, когда будет необходимо 1 мл реагента В смешать с 50 мл реагента А, оба раствора, составляющих реагент В, слить в одинаковых количествах;
- 0,6 н раствор NaOH (2,4 г NaOH внести в 100 мл мерную колбу и довести до метки после остывания);
- калибровочный раствор альбумина с концентрацией 0,25 мг в 1 мл.

К 4,7 мл 0,6 н NaOH добавить 0,1 мл пробы, то есть разведение пробы в 48 раз, откуда отбирают 0,4 мл, к которым добавляют 2 мл смеси реагента А-В. Оставить на 10 минут при комнатной температуре, затем прибавить 0,2 мл реактива Фолина, разведённого в два раза дистиллированной водой, и через 30 минут колориметрировать в 10 мм кюветах при длине волны 750 нм (660 нм).

5 ЭТАП

Активность Na-K-АТФ-азы выражается в мкмоль Рн/мг белка в час.

По кривой определяют концентрацию фосфора в 1 и 2 пробирках. Разность между ними (разность между суммарной и Mg-зависимой АТФ-азами) составляет Na-K-АТФ-азу.

Образцы при определении фосфора разводятся в 12 раз.

Полученную величину делят на концентрацию белка в пробе, вычисленную по кривой и умножают на 3, то есть пересчитывают на 1 час от инкубируемых 20-и минут.

Литература

1. Наточин Ю.В., Леонтьев В.Г., Маслова М.Н. Реабсорбции натрия и мембранные системы почек позвоночных // Эволюция биохимии и физиологии. –1975, –Т.1-2. –С.45-52