

УДК 544.77.03:53+543.9

А. Зимогляд, студ.,
В. Старова, канд. хім. наук, starova-v@ukr.net
С. Куліченко, канд. хім. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ РЯДУ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ЯК ПОКАЗНИК ЗБЕРЕЖЕННЯ НАТИВНОЇ ПРИРОДИ БІЛКІВ У ГІДРОТРОП-ІНДУКОВАНІЙ ФАЗІ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

Здатність гідротроп-індукованої міцелярно-екстракційної системи ДДСН-NaCl-H₂Sal вилучати білки із збереженням їхньої нативності була перевірена на прикладі модельних білкових субстратів пероксидази, каталази та нітратредуктази, що проявляють ферментативну активність лише в нативному стані. Зміну каталітичної активності пероксидази й каталази в міцелярній фазі ДДСН використали як показник збереження нативності білків та встановлювали методом перманганатометричного титрування за кількістю H₂O₂, що був розкладений під дією ферменту. Активність нітратредуктази визначали спектрофотометрично за реакцією нітрит-іонів, сформованих унаслідок ферментативного розкладу нітратів, з реактивом Гріса. Установлено, що каталітична активність пероксидази, нітратредуктази та каталази в міцелярній фазі ДДСН порівняно з водним розчином зростає у два, три та чотири рази відповідно. Таке збільшення каталітичної активності оксидоредуктаз підтверджує збереження нативної природи білків після концентрування їх у гідротроп-індуковану фазу ДДСН.

Ключові слова: міцелярна екстракція, гідротроп-індукована фаза, додецилсульфат натрію, білки, нативний стан.

Вступ. Аналіз білків включає етапи їхнього попереднього вилучення, концентрування та розділення. Виділення білка в нативному стані є жорсткою вимогою при проведенні імунно-хімічного аналізу, у медичній і харчовій промисловості при отриманні концентратів вірусів, бактерій та білків. Аніонна поверхнево-активна речовина додецилсульфат натрію (ДДСН) є найпоширенішим детергентом, який використовують для вилучення та концентрування білків. Однак часто застосування розчину ДДСН призводить до денатурації білків і втрати їхньої функціональної активності [1, 2]. При температурі, яка є нижчою від точки Крафта, а також у присутності електродолі в розчині ДДСН формується об'ємна кристалічна фаза, що характеризується низькими значеннями ступеню вилучення білків [3, 4]. Попередньо було встановлено, що компактна рідка міцелярна фаза ДДСН формується за одночасної присутності в розчині гідротропної добавки саліцилової кислоти (H₂Sal) та NaCl при температурі близько 25–30°C. Така фаза здатна ефективно вилучати білки різної природи при рН близькому до ізоелектричної точки (pI) та за домінування позитивно-заряджених форм білка рН ≤ pI [4, 5]. Використання міцелярно-екстракційної системи ДДСН-NaCl-H₂Sal, на нашу думку, може забезпечити стабілізацію нативного стану білків після їх концентрування.

Збереження каталітичної активності білка виступає свідченням незмінності його нативного стану в концентраті. Каталітична активність білків у міцелярних розчинах залежить від природи поверхнево-активної речовини (ПАР). Так, на прикладі пероксидази та трипсину показано, що аніонні ПАР (АПАР) здатні збільшувати ферментативну активність білка [6]. При цьому каталітична активність білка у присутності неіонної ПАР (НПАР) не змінюється, а у присутності катіонної ПАР (КПАР) – зменшується. Зменшення активності пероксидази при доданні КПАР може бути результатом уповільнення ферментативної активності білка, який має сумарний негативний заряд у розчині. Активація ферменту у присутності АПАР пов'язана з їхньою здатністю концентрувати субстрат або індукувати конформаційну перебудову ферменту при утворенні асоціату білок-ПАР. Примітно, що самі ПАР у присутності ферменту з високою пероксидазною активністю можуть піддаватися окисненню, швидкість такої реакції залежить від природи ПАР і збільшується в ряду: АПАР, КПАР та НПАР [6]. На специфіку взаємодій у системі ПАР-білок також істотно впливають добавки електролітів та органічних модифікаторів [7, 8]. Склад і

стійкість комплексів ПАР-білок залежить від природи й концентрації компонентів системи та є предметом систематичних досліджень [7, 9–14].

Оксидоредуктази проявляють ферментативну активність лише в нативному стані і вбачаються зручними об'єктами дослідження впливу компонентів міцелярно-екстракційної системи ДДСН-NaCl-H₂Sal на каталітичні властивості протеїнів. Так, пероксидазна активність каталази й пероксидази обумовлює можливість простого та експресного визначення каталітичної активності білків з використанням реакцій окиснення пероксидом водню хромогенних органічних барвників [15], а також методом перманганатометричного титрування [16]. Нітратредуктаза – фермент асиміляції азоту, яка каталізує відновлення нітрату до нітриту. За кількістю утвореного внаслідок такої ферментативної реакції нітрит-іона оцінюють активність нітратредуктази, яка, у свою чергу, виступає важливим параметром при дослідженні механізму репарації рослинних білків [17, 18].

Мета роботи. Досліджуючи зміну каталітичної активності пероксидази, каталази та нітратредуктази після їхнього концентрування у фазу ДДСН-NaCl-H₂Sal з'ясувати можливість збереження нативного стану білків у такій гідротроп-індукованій міцелярно-екстракційній системі.

Експериментальна частина. Гідротроп-індукована міцелярна фаза додецилсульфату натрію об'ємом 1 мл була одержана за методикою [4]. Робочі розчини ДДСН та NaCl готували розчиненням їхніх точних наважок у дистильованій воді, а розчин саліцилової кислоти готували розчиненням наважки в розчині 0,05 М ДДСН. ДДСН був виробництва Merck (вміст основної речовини >98,5%). Модифікуючі добавки NaCl та саліцилова кислота були кваліфікації ч.д.а. Необхідні значення рН установлювали додаванням стандартизованих 0,1М розчинів HCl та NaOH. Кислотність розчинів контролювали за допомогою рН-метра (рН-340) зі скляним електродом ESL-43-07 (Білорусь).

Як модельні білкові субстрати в роботі використовували виділені із рослинної сировини каталазу, пероксидазу та нітратредуктазу. Робочі розчини пероксидази й каталази готували згідно з методикою, наведеною у роботі [16]: для одержання розчину пероксидази 3 мл соку очищеної картоплі відбирали в колбу об'ємом 25 мл і доводили дистильованою водою до мітки, а для одержання розчину каталази до натертої на тертушці картоплі середнього розміру додавали 100 мл дистильованої води й витримували протягом 30 хв, далі одержаний розчин фільтрували через пористий паперовий фільтр (червона

стрічка). Для отримання витяжки нітратредуктази за методикою, описаною в роботі [18], до 0,2602 г подрібнених молодих паростків руколи додавали 10 мл фосфатного буферу pH=7,4, що містив $5,0 \cdot 10^{-4}$ М ЕДТА, і витримували 30 хв за кімнатної температури (20 °С).

Каталітичну активність пероксидази й каталази визначали методом перманганатометричного титрування [16]. Для цього у два мірні циліндри об'ємом 10 мл, один із яких містив 1 мл дистильованої води, а інший 1 мл міцелярної фази ДДСН, додавали по 2,5 мл робочого розчину ферменту, 5 мл $1,0 \cdot 10^{-3}$ М пероксиду водню та 1,5 мл H_2SO_4 (1:4). Одержані розчини перемішували та витримували їх на водяній бані при 37 °С протягом 30 хв. Після завершення періоду інкубації залишковий вміст H_2O_2 відтитровували стандартним розчином 0,0175 М $KMnO_4$. Робочий розчин $KMnO_4$ готували з фіксаналу та стандартизували за оксалатною кислотою згідно з [19]. Робочий розчин пероксиду водню одержували розбавленням його 3% водного розчину (антисептичний засіб, ТОВ "Гернофарм").

Паралельно проводили контрольний дослід: у два мірні циліндри об'ємом 10 мл, що містили 1 мл дистильованої води та 1 мл міцелярної фази ДДСН відповідно, додавали по 2,5 мл робочого розчину ферменту, 1,5 мл H_2SO_4 (1:4), а потім 5 мл $1,0 \cdot 10^{-3}$ М пероксиду водню. Після 30 хв інкубаційного періоду (при 37 °С, водяна баня) ці розчини титрували 0,0175 М $KMnO_4$.

Активність пероксидази й каталази визначали як кількість H_2O_2 , що був розкладений даною кількістю ферменту (одержаного з відомої наважки картоплі) у досліджуваному об'ємі розчину, та розраховували за формулою:

$A = 5 \cdot (V_0 - V_t) \cdot C_{KMnO_4} / 2 \cdot m \cdot t$, де A – активність ферменту, мкмоль/хв-г_{сировини}; $(V_0 - V_t)$ – різниця об'ємів розчину $KMnO_4$, що витрачається на титрування контрольної та досліджуваної проби; C_{KMnO_4} – молярна концентрація титрованого розчину $KMnO_4$, М; m – маса відібраної для аналізу рослинної сировини, г; t – час інкубації, хв.

Зміну каталітичної активності нітратредуктази в міцелярній фазі ДДСН контролювали спектрофотометрично за реакцією нітрит-іона, сформованого внаслідок ферментативного розкладу нітрату, з реактивом Гріса згідно з роботою [18]. До 10 мл витяжки нітратредуктази додавали 10 мл 2,0 М KNO_3 , розчин перемішували та витримували за кімнатної температури протягом інкубаційного періоду 40 хв. Одержану суміш відфільтрували крізь

ватно-марлевий фільтр. У два мірні циліндри об'ємом 20 мл, вводили по 3 мл фільтрату, у перший додавали 2 мл води, а в другий – 1 мл одержаної після фазового розшарування міцелярної фази та 1 мл води. Потім до кожного циліндру додавали 5 мл 3,0 М HCl та 5 мл 0,6 % реактиву Гріса, загальний об'єм суміші становив 15 мл. Розчини, які одержали, перемішували й витримували за кімнатної температури 30 хв.

Уміст NO_2^- іонів, що утворилися внаслідок ферментативної реакції, визначали спектрофотометрично за методом добавок. Для цього у два мірні циліндри об'ємом 20 мл додавали 3 мл фільтрату, вносили добавки 0,01 М KNO_2 . У другий циліндр додавали 1 мл міцелярної фази ДДСН. Одержані розчини розбавляли водою до 5 мл і в кожний циліндр додавали 5 мл 3,0 М HCl та 5 мл 0,6 % реактиву Гріса, перемішували й витримували 30 хв.

Робочий розчин реактиву Гріса (суміш сульфанілової кислоти та α -нафтиламіну) готували розчиненням точної наважки препарату ч.д.а. (ООО "Миранда-С"). Робочі розчини нітрату й нітриту калію готували розчиненням відповідних наважок у дистильованій воді, вихідні речовини були кваліфікації х.ч. (Реахим). Спектри поглинання одержаних водних і міцелярних розчинів вимірювали, використовуючи спектрофотометр UV/VIS 2800 (UNICO, США), $l = 1$ см, розчинами порівняння були вода та розбавлена до 15 мл міцелярна фаза ДДСН відповідно.

Активність нітратредуктази визначали як кількість NO_2^- іонів, які утворилися за дії даної кількості ферменту (одержаного з відомої наважки руколи) у досліджуваному об'ємі розчину. При цьому розрахунки проводили за формулою: $A = V_p \cdot C_x / m \cdot t$, де A – активність нітратредуктази, мкмоль/хв-г_{сировини}; M ; V_p – остаточний об'єм досліджуваного розчину, мл; C_x – визначена за методом добавок концентрація NO_2^- іонів; m – маса відібраної для аналізу рослинної сировини, г; t – час інкубації, хв.

Результати та обговорення. Дані, одержані методом перманганатометричного титрування, підтверджують здатність гідротроп-індукованої міцелярної фази ДДСН збільшувати швидкість ферментативного розкладу пероксиду водню за дії пероксидази та каталази. Так, каталітична активність пероксидази в міцелярній фазі ДДСН є вдвічі більшою порівняно із водним розчином, а активність каталази зростає практично в чотири рази, табл. 1.

Таблиця 1

Результати визначення ферментативної активності пероксидази й каталази методом перманганатометричного титрування. $C_{KMnO_4} = 0,0175$ М, $t = 30$ хв

Фермент	$m_{сировини}$, Г	$(V_0 - V_t)$, мл вода	$(V_0 - V_t)$, мл міц. фаза	$A_{вода}$, мкмоль/хв-г _{сировини}	$A_{міц.фаза}$, мкмоль/хв-г _{сировини}
Пероксидаза	47,3400	2,3	5,5	0,071	0,17
Каталаза	35,2000	1,8	7,3	0,075	0,30

Взаємодія нітрит-іона з реактивом Гріса відбувається у два етапи. На першому етапі внаслідок діазотування сульфанілової кислоти утворюється діазобензолсульфокислота, яка потім взаємодіє з α -нафтиламіном, формуючи діазобарвник червоного кольору. У водному розчині спектр поглинання цього барвника характеризується інтенсивною смугою з $\lambda_{max} \approx 527$ нм (рис. 1, а, крива 1).

Установлено, що при проведенні такої реакції в міцелярній фазі ДДСН- $NaCl$ - H_2Sal сформована діазобензолсульфокислота, на другому етапі здатна взаємодіяти з цільовим α -нафтиламіном та вступати в конкуруючу реакцію з саліциловою кислотою. При цьому на спектрі поглинання продуктів реакції реактиву Гріса та нітрит-іонів, сформованих унаслідок ферментативної дії нітратредуктази, спостерігається дві смуги поглинання: смуга при $\lambda_{max} \approx 503$ нм відповідає продукту взаємодії

діазобензолсульфокислоти та саліцилової кислоти, а друга смуга при $\lambda_{max} \approx 552$ нм – утвореному діазобарвнику на основі α -нафтиламіну (рис. 1, а, крива 2 та рис. 1, б). Згідно з рис. 1 у міцелярному розчині ДДСН інтенсивність смуги поглинання діазобарвника зростає, а максимум поглинання зміщується батохромно відносно смуги поглинання у водному розчині $\Delta\lambda \approx 25$ нм.

Концентрацію нітрит-іонів, сформованих унаслідок ферментативного розкладу нітратів, визначали графічно за методом добавок на основі лінійних залежностей: для водної фази $A^{527} = f(C_{добавки})$, одержане рівняння має вигляд $0 = 0,215 + 2385 \cdot C_x$; для міцелярної фази ДДСН $A^{552} = f(C_{добавки})$, рівняння – $0 = -0,50 + 2015 \cdot C_x$. Результати розрахунку значення C_x та активності нітратредуктази у воді й міцелярній фазі ДДСН наведено в табл. 2.

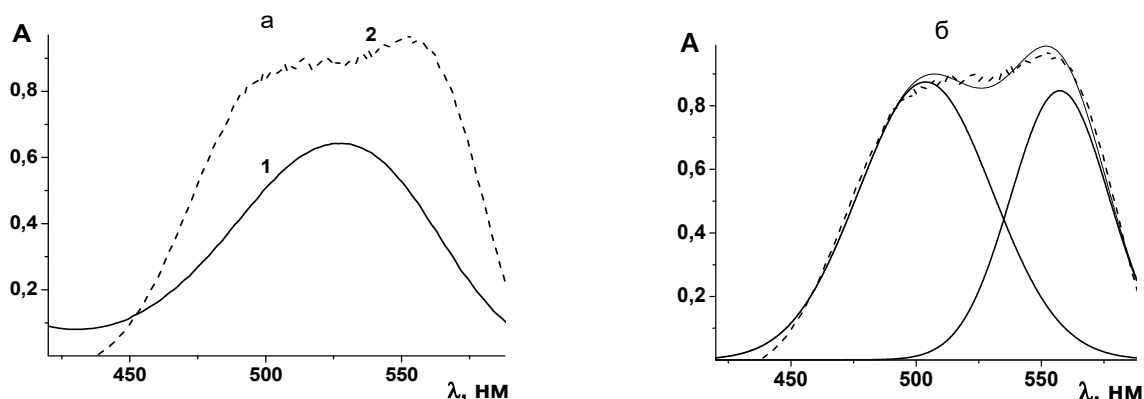


Рис. 1. Спектр поглинання продуктів реакції реактиву Гріса та нітрит-іонів, сформованих унаслідок ферментативної дії нітратредуктази, у воді (крива 1, а) і в мицелярній фазі ДДСН (крива 2, а, б). Спектр отримано експериментально (крива 1, а, 2, а) і розраховано за Гауссом (б)

Таблиця 2

Результати визначення активності нітратредуктази за кількістю нітрит-іонів, утворених унаслідок ферментативного розкладу нітратів.
 $m_{\text{сировини}} = 0,2602 \text{ г}, V_p = 15 \text{ мл}, t = 40 \text{ хв}$

Розчин	$C_x, \text{М}$	$A,$ мкмоль/хв·г _{сировини}
Вода	$9,0 \cdot 10^{-5}$	0,13
Мицелярна фаза ДДСН	$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,36

Активність нітратредуктази у мицелярній фазі ДДСН визначена на основі залежності $A^{503} = f(C_{\text{добавки}})$, характерної для продукту взаємодії саліцилової кислоти та діазобензолсульфо кислоти (рівняння $0 = -0,48 + 2242C_x$), становить 0,31 мкмоль/хв·г_{сировини}.

Отже, каталітична активність нітратредуктази в гідротроп-індукованій мицелярній фазі ДДСН збільшується практично у три рази порівняно з водним розчином (табл. 2).

Висновок. Підвищення каталітичної активності досліджених у роботі оксидоредуктаз у гідротроп-індукованій фазі ДДСН підтверджує збереження нативного стану білків після їх вилучення та свідчить про перспективність використання такої мицелярно-екстракційної системи для концентрування мікрокількостей білків.

Список використаних джерел

- Johnson M., Yakimchuk K. Materials and methods, 2013, 3, 163.
- Matar-Merheb R., Rhimi M., Leydier A., Huchy F., Galibon C., Desuzinges-Mandon E., Ficheux D., Flot D., Aghajari N., Kahn R., Di Pietro A., Jault J.M., Coleman A.W., Falson P. PLoS ONE, 2011, 6(3), e18036.
- Kulichenko S.A., Starova V.S. Chem. Pap., 2010, 64 (1), 98–105.
- Starova V.S., Kulichenko S.A. J. Anal. Chem., 2010, 65 (12), 1244–1249.
- González de la Vara L.E., Alfaro B.L. Anal. Biochem., 2009, 387 (2), 280–286.
- Давлетшин А.И., Сильвестрова И.Г., Zubov B.P., Egorov B.V. Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya, 1998, 39 (4), 272–275.
- Davletshin A.I., Silvestrov I.G., Zubov V.P., Egorov V.V. Vestn. Moscow. Unta. Ser.2. Chemistry, 1998, 39 (4), 272–275.
- Еремин А.Н., Карасева Е.И. Биоорганическая химия, 1991, 17 (5), 610–617.
- Eremin A.N., Karaseva E.I. Bioorganic Chemistry, 1991, 17 (5), 610–617.
- Brewer G.J. Singh M. J. Gen. Virol., 1982, 60 (1), 135–146.
- Кукушкина А.Н., Деркач С.Р., Ужинов Б.М., Левачев С.М., Сакварелидзе М.А. Известия Калининградского государственного технического университета, 2008, 13, 59–62.

- Kukushkina A.N., Derkach S.R., Uzhinov B.M., Levachev S.M., Sakvarelidze M.A. Izvestija Kaliningradskogo gosudarstvennogo tehniceskogo universiteta, 2008, 13, 59–62.
- Кудряшова Е.В., Гладили А.К., Левашов А.В. Успехи биологической химии, 2002, 42, 257–294.
- Kudryashova E.V., Gladilin A.K., Levashov A.V. Uspehi biologicheskoy khimii, 2002, 42, 257–294.
- Mackie A., Wilde P. Adv. Colloid Interface Sci., 2005, 117 (1–3), 3–13.
- Tofani L., Feis A., Snoko R.E., Berti D., Baglioni P., Smulevich G. Biophys. J., 2004, 87 (2), 1186–1195.
- Chodankar S., Aswal V.K., Hassan P.A., Wagh A.G. Physica B Condens. Matter., 2007, 398 (1), 112–117.
- Shweitzer B., Zanette D., Itri R. J. Colloid Interface Sci., 2007, 277 (2), 285–291.
- Наджафова О.Ю., Дроздова М.В., Босак В.З. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Хімія, 2006, 43, 23–25.
- Najafova O.Yu., Drozdova M.V., Bosak V.Z. Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka. Khimiya, 2006, 43, 23–25.
- Наджафова О.Ю. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу "Біоаналітика" для студентів хімічного факультету кафедри аналітичної хімії. К.: ВПЦ Київський університет, 2006, 35 с.
- Najafova O.Yu. Methodical instructions for the implementation of laboratory works on the course "Bioanalysis" for students of the chemical faculty of the Department of Analytical Chemistry. Kyiv, VPC Kyiv University, 2006, 35 p.
- Desvergne B., Wahli W. Endocr. Rev., 1999, 20 (5), 649–688.
- Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие. Под ред. проф. А.А. Чиркина. Минск: Выш. шк., 2013, 497 с.
- Modern problems of biochemistry. Methods of Research. Ed. by Prof. A.A. Chirkin. Minsk: Higher Education school, 2013, 497 p.
- Запорожець О.А., Наджафова О.Ю., Смик Н.І. Методичні вказівки до лабораторних робіт з аналітичної хімії для студентів другого курсу хімічного факультету. К.: Київський ун-т, 2005, 50 с.
- Zaporozhets O.A., Najafova O.Yu., Smyk N.I. Methodical instructions for laboratory studies on analytical chemistry for second-year students of the chemical faculty. Kyiv, Kyiv Univ., 2005. 50 p.

Надійшла до редколегії 12.10.17

А. Зимогляд, студ.,
В. Старова, канд. хим. наук
С. Куличенко, канд. хим. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ РЯДА ОКСИДОРЕДУКТАЗ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СОХРАНЕНИЯ НАТИВНОЙ ПРИРОДЫ БЕЛКОВ В ГИДРОТРОП-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФАЗЕ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Способность гидротроп-индуцированной мицеллярно-экстракционной системы ДДСН-NaCl-H₂Sal извлекать белки с сохранением их нативности была проверена на примере модельных белковых субстратов пероксидазы, каталазы и нитратредуктазы, которые проявляют ферментативную активность только в нативном состоянии. Изменение каталитической активности пероксидазы и каталазы в мицеллярной фазе ДДСН использовали как показатель сохранения нативности белков и определяли методом перманганатометрического титрования по количеству H₂O₂, что разложилось под действием фермента. Активность нитратредуктазы контролировали спектрофотометрически по реакции нитрит-ионов, сформировавшихся вследствие ферментативного разложения нитратов, с реактивом Грисса. Установлено, что каталитическая активность пероксидазы, нитратредуктазы и каталазы в мицеллярной фазе ДДСН сравнительно с водным раствором увеличивается в два, три и четыре раза соответственно. Такое увеличение каталитической активности оксидоредуктаз подтверждает сохранение нативной природы белков после их концентрирования в гидротроп-индуцированную фазу ДДСН.

Ключевые слова: мицеллярная экстракция, гидротроп-индуцированная фаза, додецилсульфат натрия, белки, нативное состояние.

A. Zimoglyad, student
V. Starova, PhD
S. Kulichenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ENZYMATIC ACTIVITY THE SERIES OF OXIDOREDUCTASES AS INDICATOR OF PROTEINS NATIVE STATE PRESERVATION INTO HYDROTROPE-INDUCED PHASE OF SODIUM DODECYL SULPHATE

Preserving the proteins native nature after their extraction is a strict requirement in immuno-chemical analysis, medical and food industry at receiving concentrates of viruses, bacteria and proteins. Anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) is the most common detergent that is used for extraction and preconcentration of proteins. However, using of SDS solution often leads to denaturation of proteins and loss of their functional activity. Hydrotrope-induced micellar phase of the SDS (SDS-NaCl-H₂Sal) is considered as a rational alternative to classical extragens, due to its ability to quantitatively extract of proteins molecules at pH close to the isoelectric point of the protein (pI) and at conditions of their positively charged forms domination (pH ≤ pI). From our point of view, using of the SDS-NaCl-H₂Sal phase can provide a stabilization of the native state of proteins after their preconcentration. The objective of the work was to evaluate the possibility of proteins native state preservation after their preconcentration into SDS hydrotrope-induced phase. Peroxidase, catalase and nitrate reductase were chosen as protein model substrates. The change in the catalytic activity of these oxidoreductases in SDS micellar phase was used as indicator of proteins native state preservation.

The activity of peroxidase and catalase was determined by the method of permanganometric titration as the amount of H₂O₂ that was decomposed under the action of the enzyme. The activity of nitrate reductase was determined spectrophotometrically by the reaction of Griess reagent with nitrite ions formed as a result of the enzymatic decomposition of nitrates. It has been established that the catalytic activity of peroxidase, nitrate reductase and catalase in the SDS micellar phase increases in two, three and four times in comparison with the aqueous solution, respectively. Such rising of oxidoreductases catalytic activities after their preconcentration into the hydrotrope-induced phase of SDS confirms the preservation of proteins native nature.

Keywords: micellar extraction, hydrotrope-induced phase, sodium dodecylsulfate, proteins, native state.