

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Международный государственный экологический
университет имени А. Д. Сахарова»



Факультет экологической медицины
Кафедра биохимии и биофизики

Л. М. Шейко, С. Б. Бокуть

**ПРАКТИКУМ ПО МЕДИЦИНСКОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКЕ**

**Раздел
«Биологическая физика»**

«Методы биофизических исследований»

Минск
2011

УДК 577(076.5)

ББК 28.9

ШЗ6

*Рекомендовано к изданию НМС МГЭУ им. А. Д. Сахарова
(протокол № 6 от 15 февраля 2011 г.)*

Автор:

Л. М. Шейко, доцент кафедры биохимии и биофизики
МГЭУ им. А. Д. Сахарова, к.б.н.;

С. Б. Бокуть, зав. кафедрой биохимии и биофизики
МГЭУ им. А. Д. Сахарова, доцент, к.б.н.

Рецензенты:

зам. директора по научной работе, зав. лабораторией медицинской биофизики
Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, д.б.н.,

член-корр. НАН Беларуси *Слобожанина Е. И.*;

зав. кафедрой экологической медицины и радиобиологии
МГЭУ им. А. Д. Сахарова, доцент, к.б.н. *Свирид В. Д.*

ШЗ6 Шейко, Л. М.

Практикум по медицинской и биологической физике. Раздел «Биологическая физика»: Методы биофизических исследований / Л. М. Шейко, С. Б. Бокуть. – Минск: МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2011. – 64 с.

ISBN 978-985-551-007-0.

Практикум содержит учебно-методические материалы для проведения лабораторных работ по специальной дисциплине «Медицинская и биологическая физика, раздел «Биологическая физика» со студентами 3-го курса. Для каждой лабораторной приводятся теоретические основы по конкретной теме, вопросы для подготовки к занятию, список рекомендуемой литературы, перечень заданий к занятию, описание используемых в работе приборов, материалов и реактивов. В пособие включены материалы, описывающие принципы методов, наиболее часто используемых при исследовании структурно-функциональных особенностей биологических объектов. Соответствует учебной программе курса «Медицинская и биологическая физика» для студентов МГЭУ им. А. Д. Сахарова.

Материал всех лабораторных занятий написан авторами настоящего издания совместно.

УДК 577(076.5)

ББК 28.9

ISBN 978-985-551-007-0

© Шейко Л. М., Бокуть С. Б., 2011

© Международный государственный
экологический университет
имени А. Д. Сахарова, 2011

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1	5
Методы центрифугирования. Выделение эритроцитарных мембран методом дифференциального центрифугирования (метод Доджа)	
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2	21
Исследование оптических свойств биополимеров методом спектрофотометрии	
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3	40
Применение метода спектрофлуориметрии для исследования биологических систем	
ПРИЛОЖЕНИЕ Техника выполнения лабораторных работ	59

ВВЕДЕНИЕ

Освоение современных высокочувствительных методов исследования молекулярных механизмов биологических процессов входит в программу курса медицинской и биологической физики раздела «Биологическая физика» и занимает в ней важное место. Данный раздел дисциплины представляет собой неотъемлемую часть профессиональной подготовки специалистов медико-биологического профиля.

Настоящее учебное пособие включает материал для проведения трех лабораторных работ со студентами 3-го курса факультета экологической медицины МГЭУ им. А. Д. Сахарова. В первой лабораторной работе даются практические рекомендации к применению препаративного метода выделения мембранных препаратов. В двух последующих работах значительное место уделяется теоретическим основам и практическому использованию оптических методов исследования, основанных на взаимодействии биомолекул и надмолекулярных структур с электромагнитным излучением. Это методы спектрофотометрии и спектрофлуориметрии, которые широко используются в различных областях биологии, медицины, экологии для качественного и количественного анализа, изучения структурно-функционального состояния и механизмов функционирования биомолекул и их комплексов. В конце пособия имеется приложение, в котором изложены вопросы, связанные с техникой выполнения лабораторных работ и условиями эффективной работы в лаборатории.

Отличительная особенность данного практикума состоит в том, что в нем сделан акцент не на постановку большого числа задач, а на раскрытие физико-химических основ каждого из методов и особенностей их использования в исследованиях молекулярных механизмов биологических процессов. Такой подход направлен на формирование у студентов необходимых знаний и умений, приобретение которых будет полезным при прохождении последующих курсов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Тема:	Методы центрифугирования. Выделение эритроцитарных мембран методом дифференциального центрифугирования (метод Доджа)
Цель:	Освоить методику выделения осмотически интактных плазматических мембран эритроцитов крови доноров

Оборудование и материалы

- Рефрижераторная центрифуга Avanti J-30 I
- рН-метр
- Весы центрифужные
- Пробирки центрифужные
- Штатив для пробирок
- Мерные стаканы на 25, 50, 500 мл
- Цилиндры мерные на 250 и 100 мл
- Колбы емкостью 100 и 250 мл
- Пипетки автоматические
- Пипетки стеклянные на 1, 5 и 10 мл
- Стеклянная палочка
- Ледяная баня
- Ртутный термометр 0–100 °С
- Фильтровальная бумага
- Резиновые перчатки

Реактивы

- Кровь доноров с антикоагулянтом
- Хлорид натрия (NaCl), 155 мМ (изотонический) раствор
- Na-фосфатный буфер, 155 мМ раствор pH 7.4
- Na-фосфатный буфер, 10 мМ раствор pH 7.4
- Вода дистиллированная

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Принцип метода центрифугирования

Центрифугирование представляет собой метод препаративного или аналитического разделения клеточных органелл, надмолекулярных структур и биополимеров, основанный на том, что поведение указанных частиц в центробежном поле определяется рядом их собственных специфических параметров – размером, формой и плотностью. Важно также учитывать парамет-

ры, связанные с влиянием среды, в которой находится суспензия разделяемых частиц. Теоретические основы этого метода состоят в воздействии силы тяжести на частицы (в том числе макромолекулы), находящиеся во взвешенном состоянии в водной среде. При центрифугировании создаваемая центробежная сила служит для ускорения процесса разделения анализируемых фракций.

Центрифугирование бывает двух видов: препаративным и аналитическим. В качестве препаративного метода центрифугирование используется для очистки препаратов или для разделения смеси гетерогенных частиц с целью их дальнейшего исследования.

При аналитическом центрифугировании за движением частиц следят непосредственно в процессе разделения с помощью специальной встроенной оптической системы. Анализ молекулярной массы, размера, формы и плотности, таким образом, можно осуществлять непосредственно в процессе центрифугирования.

Принцип метода центрифугирования заключается в следующем. Частицы в растворе *осаждаются (седиментация)*, когда их плотность выше плотности раствора, или *всплывают (флотация)*, когда их плотность ниже плотности раствора. Чем больше разница в плотности, тем быстрее идет распределение частиц. Когда плотности частиц и раствора одинаковы (*изопикнические условия*), частицы остаются неподвижными. При малой разнице в плотности частицы можно разделить только в центрифуге, которая создает центробежную силу, во много раз превышающую силу земного притяжения.

Скорость седиментации частиц при центрифугировании зависит от центробежного ускорения и выражается следующей зависимостью:

$$G = \omega^2 r,$$

где G – центробежное ускорение; ω – угловая скорость ротора; r – расстояние между частицей и осью вращения.

Поскольку один оборот ротора составляет 2π радиан, угловую скорость ротора в оборотах в минуту (об/мин) можно записать так:

$$\omega = 2\pi \text{ об} \times \text{мин}^{-1} / 60,$$

тогда центробежное ускорение будет равно:

$$G = 4\pi^2 (\text{об} \times \text{мин}^{-1})^2 \times r / 3600.$$

Возникающая в центрифуге центробежная сила, которая, строго говоря, создается ускорением, обычно выражается числом, кратным ускорению свободного падения g ($g = 9,81 \text{ м/с}^2$).

Центробежное ускорение, выраженное в единицах g , называется *относительным центробежным ускорением*:

$$\text{ОЦУ} = 4\pi^2 (\text{об} \times \text{мин}^{-1})^2 \times r / 3600 \times 980 \text{ или}$$

$$\text{ОЦУ} = 1,11 \times 10^{-5} (\text{об} \times \text{мин}^{-1}) \times r.$$

Относительное центробежное ускорение рассчитывается из среднего радиуса вращения ($r_{\text{средн}}$) столбика жидкости в центрифужной пробирке (т. е. расстояния от оси вращения до середины столбика жидкости).

Скорость седиментации сферических частиц зависит не только от центробежного ускорения, но и от плотности и радиуса самих частиц и от вязкости среды суспендирования:

$$V = \omega^2 r S,$$

где S – коэффициент седиментации, зависящий от молекулярной массы частицы, парциального объема частицы, плотности раствора, коэффициента трения. Значение коэффициента седиментации рассчитывают по формуле:

$$S = k D^2 (\rho_c - \rho) / \eta,$$

где k – коэффициент трения для сферических частиц равен 1/18; D – диаметр частицы; ρ_c – плотность частицы; ρ – плотность среды; η – вязкость среды.

Коэффициент седиментации не зависит от скорости вращения и типа ротора. Значение коэффициента седиментации выражается в единицах Сведберга ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ с}$) и характеризует седиментационные свойства частиц. Величина S может колебаться в широких пределах. Чем больше значение S , тем быстрее частицы осаждаются. Для сравнения коэффициентов седиментации в различных средах их обычно корректируют по плотности и вязкости воды при 20°C (S_{20w}).

Из приведенных выше рассуждений следуют выводы:

1. Скорость седиментации (V) пропорциональна плотности частицы. Возможна ситуация, когда мелкие, но более плотные частицы будут оседать быстрее, чем крупные.

2. При одинаковых плотностях частицы большего размера осаждаются быстрее, чем мелкие (в формулу входит D^2).

3. Чем выше вязкость среды (η), тем медленнее осаждаются частицы.

При заданной скорости вращения ротора время, необходимое для осаждения гомогенных сферических частиц, прямо пропорционально вязкости среды и обратно пропорционально квадрату их радиусов и разности плотностей частиц и среды:

$$t = 9/2 \times \eta / 2\omega^2 r_c^2 (\rho_c - \rho),$$

где t – время седиментации; η – вязкость среды; r_c – радиус частицы; ρ_c – плотность частицы; ρ – плотность среды.

По этой причине смесь гетерогенных, сферических частиц, различающихся по плотности и (или) размерам, можно разделить за счет разного времени осаждения их на дно пробирки при данном ускорении.

Следует заметить, что плотность частицы обусловлена не только ее химическим составом и пространственной структурой, но и количеством прочно связанной с ней воды. Эта вода при центрифугировании движется вместе с частицей, значительно уменьшая ее эффективную плотность. В присутствии

высокой концентрации ионов и гидрофильных молекул количество связанной с частицами воды уменьшается. Они связывают воду и, тем самым, препятствуют гидратации частиц. Однако некоторые ионы или молекулы могут прочно связываться с частицами, увеличивая их эффективную плотность.

Таким образом, эффективная плотность частиц, определяющая скорость их оседания, зависит от химической природы и концентрации веществ, растворенных в среде, в которой ведется центрифугирование. Поэтому для данных частиц в данной среде вводят понятие «плавучей плотности». Этот показатель можно определить экспериментально, измерив плотность среды, в которой движение частиц прекращается, как только разность $\rho_{ч}-\rho$ становится равной нулю. Так же как плотность и вязкость среды, степень гидратации частиц зависит от температуры.

Роторы

Главным рабочим устройством любой центрифуги является ротор. Существуют два основных типа роторов – *угловые* (рис. 1.1, а) и *свободно подвешенные*, т. н. *бакет-роторы* (рис. 1.1, б). Угловой ротор предназначен для получения плотного осадка на дне центрифужной пробирки. Бакет-ротор также можно использовать для получения плотного осадка, однако он чаще используется в высокоскоростных центрифугах и ультрацентрифугах при центрифугировании в градиенте плотности.



Рис. 1.1. Типы роторов, используемых при центрифугировании

Бакет-роторы снабжены специальными держателями для свободноподвешенных металлических гильз, в которые помещаются центрифужные пробирки. Первоначально свободное подвешивание служит только для фиксации исходного положения «бакетов». Уже при самой малой скорости вращения ротора металлические гильзы отклоняются и занимают горизонтальное положение.

Центрифугирование в градиенте плотности

Макромолекулы или органеллы, незначительно различающиеся по размеру или по плотности, можно разделить центрифугированием в градиенте плотности. Вещество, используемое для приготовления градиента, долж-

но быть легко растворимо в воде, физиологически безвредно и химически инертно. Его раствор должен быть вязким, прозрачным в видимой и УФ-областях спектра, а также должен создавать низкое осмотическое давление. Обычно разделение клеточных компонентов проводят в градиенте плотности сахарозы. Раствор сахарозы удовлетворяет большинству указанных выше требований.

Градиенты плотности могут быть непрерывными (линейными) и ступенчатыми. Ступенчатый градиент предпочтителен в случае препаративного фракционирования клеток, поскольку его легко готовить и он обеспечивает получение мембранных фракций с удовлетворительными чистотой и выходом. Для формирования ступенчатого градиента в центрифужную пробирку с помощью пипетки наслаивают равные объемы раствора носителя (сахарозы) различной концентрации. При этом каждый последующий слой является раствором меньшей концентрации. Таким образом, самый плотный раствор носителя расположен у дна пробирки. Препарат для разделения, как правило, в буферном растворе, наслаивается поверх градиента.

Центрифугирование с использованием линейного градиента плотности предусматривает предварительную более сложную подготовку носителя, при которой концентрация носителя должна линейно возрастать от верха пробирки к ее дну.

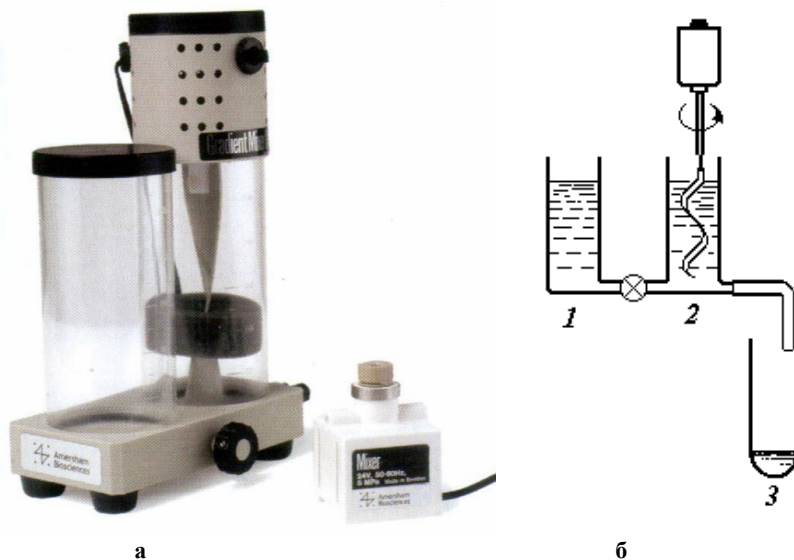


Рис. 1.2. а – внешний вид градиентного смесителя GM-1; б – принципиальная схема работы смесителя для создания линейного градиента плотности: 1 – сосуд с низкой концентрацией носителя (сахароза), 2 – сосуд с высокой концентрацией носителя, 3 – центрифужная пробирка

На рис. 1.2, б представлена схема устройства для формирования линейного градиента плотности носителя, применяемого для разделения частиц и макромолекул. Градиентный смеситель представляет собой систему из двух сообщающихся сосудов одинакового диаметра, один из которых является сосудом-смесителем. Формирование градиента происходит непосредственно в центрифужной пробирке путем регулирования скоростей смешивания растворов высокой и низкой концентраций (одинакового объема) и скорости оттока смеси из устройства в пробирку. В этом случае плотность среды максимальна у дна центрифужной пробирки и минимальна в верхней ее части. Скорость заполнения пробирки зависит от ее диаметра и во избежание хаотичного перемешивания содержимого в среднем не должна превышать 1 мл/мин.

Для разделения частиц в градиенте плотности используют два метода: *зональное центрифугирование* и *изопикническое центрифугирование*.

При *зональном центрифугировании* (рис. 1.3) анализируемая проба (например, белки или клетки) наслаивается тонким слоем поверх раствора с непрерывным градиентом плотности. Образец центрифугируют до тех пор, пока частицы не распределятся вдоль градиента в виде дискретных зон. В процессе центрифугирования частицы проходят через раствор, т. к. их плотность выше плотности раствора. Скорость движения зависит от массы и формы частиц.

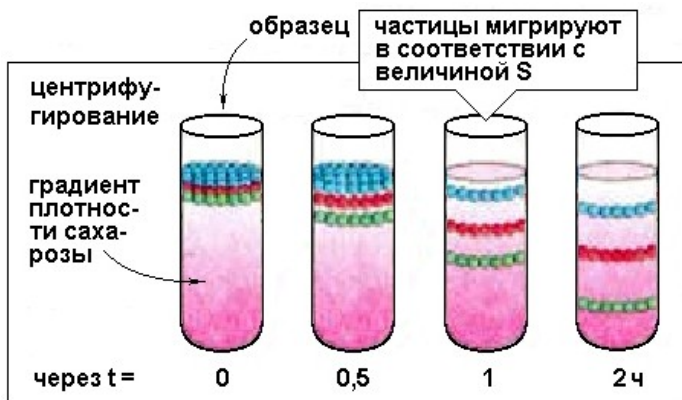


Рис. 1.3. Метод зонального центрифугирования: последовательность стадий

Центрифугирование прекращают прежде, чем частицы достигнут дна центрифужной пробирки. Затем дно прокалывают и собирают ряд фракций, содержащих различные частицы. Стабильность градиента плотности в процессе центрифугирования достигается применением растворов углеводов (обычно сахарозы) или коллоидного силикагеля, концентрация которых возрастает от поверхности к дну пробирки. Градиент плотности препятствует образованию конвекционных потоков, снижающих качество разделения.

При *изопикническом центрифугировании* (рис. 1.4) пробу (например, ДНК, РНК или вирусы) равномерно распределяют во всем объеме раствора. При этом способе разделения для создания градиента растворы сахарозы не используют. Например, нуклеиновые кислоты имеют плавучую плотность значительно выше, чем самый концентрированный раствор сахарозы. Чаще всего для этих целей используют концентрированные растворы солей, обычно CsCl или Cs₂SO₄, а также соли рубидия. При изопикническом центрифугировании разделение продолжается значительно дольше, чем при зональном. Градиент плотности создается в процессе центрифугирования за счет седиментации и диффузии. Со временем каждая частица попадает в область, соответствующую ее собственной плавучей плотности. В ходе центрифугирования более легкие частицы всплывают, в то время как тяжелые оседают на дно пробирки. Эта особенность используется, например, при количественном разделении лизосом, митохондрий и пероксисом, основанном на удалении из гомогенной среды всех частиц с большей, чем у микросом, плотностью и последующем изопикническом центрифугировании выпавших в осадок тяжелых частиц.



Рис. 1.4. Метод изопикнического центрифугирования: последовательность стадий

Центрифугирование прекращают, когда устанавливается равновесие между плотностью соответствующей зоны носителя и собственной плавучей плотностью частиц, попадающих в эти зоны. Полученные фракции анализируют, используя подходящую измерительную технику.

Метод дифференциального центрифугирования

Метод дифференциального центрифугирования основан на различиях в скоростях седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью. Разделяемый материал, например гомогенизированные ткани, центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое выбирается так, чтобы на каждом этапе на дно пробирки осаждалась определенная фракция. В конце каждой стадии осадок отделяют от надоса-

дочной жидкости (*супернатанта*) и несколько раз промывают, чтобы в конечном итоге получить чистую осадочную фракцию. Дальнейшее центрифугирование супернатанта при последующем увеличении центробежного ускорения приводит к седиментации частиц средних размеров и плотности, а затем к осаждению самых мелких частиц. Дифференциальное центрифугирование является самым распространенным методом выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей (рис. 1.5). Фракционирование субклеточных компонентов из экстрактов клеток (например, печени) осуществляется путем повторного центрифугирования супернатанта при постепенно возрастающих скоростях. В общем случае, чем меньше по размерам субклеточный компонент, тем более высокая центробежная сила требуется для его осаждения. Обычно на различных этапах центрифугирования требуются следующие условия: низкая скорость (1000 g) – 10 мин., средняя скорость (20 000 g) – 20 мин., высокая скорость (80 000 g) – 1 ч, очень высокая скорость (150 000g) – 3 ч.

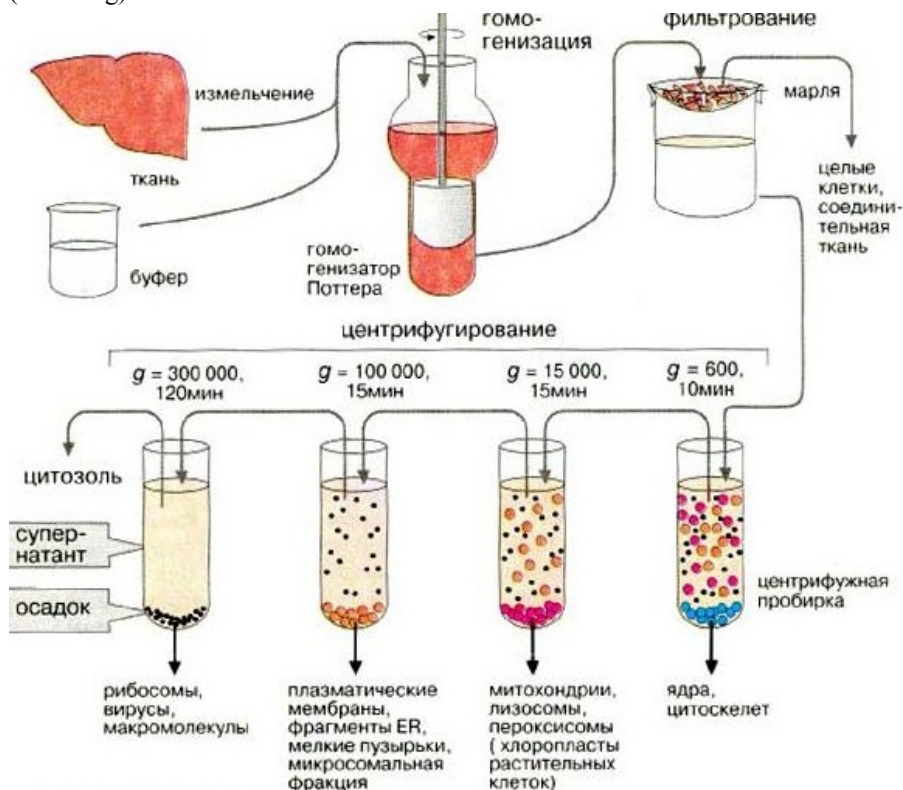


Рис. 1.5. Метод дифференциального центрифугирования: последовательность стадий

Эритроциты

Красные кровяные клетки, или эритроциты (от греч. *erythros* – красный и *kytos* – вместилище, здесь – клетка), – высокоспецифичные клетки крови животных и человека, содержащие важнейший транспортный белок гемоглобин. Именно благодаря присутствию гемоглобина эритроциты осуществляют перенос кислорода от легких к тканям и двуокиси углерода от тканей к органам дыхания. Сухое вещество эритроцита человека содержит около 95 % гемоглобина и 5 % других веществ – белков и липидов. У человека и млекопитающих животных эритроциты лишены ядра и имеют форму двояковогнутых дисков. Специфическая форма эритроцитов обуславливает более высокое отношение поверхности к объему, что увеличивает эффективность газообмена. У акул, лягушек и птиц эритроциты овальной или округлой формы, содержат ядра. Средний диаметр эритроцитов человека 7–8 мкм, что приблизительно равно диаметру кровеносных капилляров. Эритроцит способен «складываться», «деформироваться» при прохождении по капиллярам, просвет которых меньше диаметра этих клеток.

Продолжительность жизни эритроцитов у взрослых людей составляет около 3 месяцев, после чего они разрушаются в печени или селезенке. Каждую секунду в организме человека разрушается от 2 до 10 млн эритроцитов. Старение эритроцитов сопровождается изменением их формы. В периферической крови здоровых людей количество эритроцитов правильной формы (дискоцитов) составляет 85 % от общего их числа. При старении эритроцита его белковые компоненты расщепляются на составляющие их аминокислоты, а железо, входившее в состав гема, удерживается печенью и может в дальнейшем использоваться повторно при образовании новых эритроцитов. Остальная часть гема расщепляется с образованием желчных пигментов билирубина и биливердина. Оба пигмента, в конце концов, выводятся с желчью в кишечник. Разрушение эритроцитов, сопровождающееся гемолизом – выходом содержимого клетки в окружающую плазму, может происходить как вследствие внутренних дефектов клеток (например, при наследственном сфероцитозе), так и под влиянием неблагоприятных факторов микроокружения (например, токсинов неорганической или органической природы). Обширный гемолиз приводит к снижению общего количества циркулирующих в крови эритроцитов (гемолитическая анемия).

Важной физиологической характеристикой крови является содержание эритроцитов, выражаемое в миллионах красных кровяных клеток в соответствующем объеме. Таким объемом принято считать 1 мкл. Физиологической нормой содержания эритроцитов у женщин является 3,9–4,9 млн клеток/мкл, у мужчин – 4–5,5 млн/мкл. Более высокое содержание эритроцитов у мужчин связано с влиянием мужских половых гормонов – андрогенов, стимулирующих образование эритроцитов. Количество эритроцитов варьирует в зависимости от возраста и состояния здоровья. Повышение числа эритроцитов чаще

всего связано с кислородным голоданием тканей или с легочными заболеваниями, врожденными пороками сердца, может возникать при курении, нарушении эритропоэза (процесс образования эритроцитов в красном костном мозге) из-за опухоли или кисты. Понижение количества эритроцитов является непосредственным указанием на анемию (малокровие). В запущенных случаях при ряде анемий отмечается неоднородность эритроцитов по величине и форме, в частности, при железодефицитной анемии у беременных.

Функции эритроцитов

Эритроцитам присущи три важнейшие физиологические функции: *транспортная, защитная и регуляторная.*

Транспортная функция эритроцитов заключается в их способности переносить O_2 и CO_2 , аминокислоты, полипептиды, белки, углеводы, ферменты, гормоны, жиры, холестерин, различные биологически активные соединения (простагландины, лейкотриены и др.), микроэлементы и др. В капиллярах легочных альвеол, где концентрация кислорода высока, гемоглобин соединяется с кислородом, а в метаболически активных тканях, где его концентрация низка, кислород освобождается и диффундирует из эритроцита в окружающие клетки. Процент насыщения крови кислородом зависит от его парциального давления в атмосфере. Сродство двухвалентного железа, входящего в состав гемоглобина, к окиси углерода (СО) в несколько сотен раз больше его сродства к кислороду, поэтому в присутствии даже очень малого количества окиси углерода гемоглобин в первую очередь связывается именно с СО. После вдыхания окиси углерода у человека быстро развивается коллапс и он может погибнуть от удушья. С помощью гемоглобина также осуществляется перенос углекислоты. В ее транспорте участвует и содержащийся в эритроцитах фермент карбоангидраза.

Защитная функция эритроцитов заключается в том, что они играют существенную роль в специфическом и неспецифическом иммунитете и принимают участие в сосудисто-тромбоцитарном гемостазе, свертывании крови и фибринолизе.

Регуляторную функцию эритроциты осуществляют благодаря содержащемуся в них гемоглобину: регулируют рН крови, ионный состав плазмы и водный обмен. Проникая в артериальный отдел капилляра, эритроцит отдает воду и растворенный в ней O_2 , уменьшаясь при этом в объеме, а переходя в венозный отдел капилляра, связывает воду, CO_2 , продукты обмена, поступающие из тканей, и увеличивается в объеме. Благодаря эритроцитам во многом сохраняется относительное постоянство состава плазмы. Это касается не только солей. В случае увеличения концентрации в плазме белков эритроциты их активно адсорбируют. Если же содержание белков в крови уменьшается, то эритроциты отдают их в плазму.

Эритроциты являются носителями глюкозы и гепарина, обладающего выраженным противосвертывающим действием. Эти соединения при увели-

чении их концентрации в крови проникают через мембрану внутрь эритроцита, а при снижении их концентрации – вновь поступают в плазму. Кроме того, эритроциты являются регуляторами эритропоэза, т. к. в составе этих клеток содержатся эритропоэтические факторы, поступающие при разрушении эритроцитов в костный мозг и способствующие образованию новых эритроцитов.

В клинике по скорости оседания эритроцитов (СОЭ) судят о состоянии организма человека. В норме СОЭ у мужчин 1–10 мм/час, у женщин – 2–15 мм/час. Повышение СОЭ – высокочувствительный, но неспецифический тест на активно протекающий воспалительный процесс. При пониженном количестве эритроцитов в крови СОЭ возрастает. Снижение СОЭ наблюдается при различных эритроцитозах.

Мембраны эритроцитов (ghosts – «тени»). **Механизм осмотического гемолиза эритроцитов**

Биологическим мембранам принадлежит ключевая роль в обеспечении и регуляции физиологической активности клеток. Отделяя цитоплазму от внешней среды и осуществляя транспорт веществ, мембраны активно участвуют в поддержании клеточного гомеостаза. Мембраны являются местом локализации важнейших полифункциональных ферментных комплексов. Определяющую роль играют мембраны в процессе обмена клеток информацией с внешней средой. Практически все клеточные функции прямо или косвенно связаны с мембранными системами. Модель биологической мембраны приведена на рис. 1.6.

Широкое применение для исследования структуры, свойств и функционирования биомембран получили препараты мембран эритроцитов. Эритроциты являются сравнительно простыми клетками, лишенными ядра, митохондрий и других внутриклеточных включений. У эритроцитов имеется только цитоплазматическая мембрана, отделяющая цитоплазму от внешней среды, поэтому мембранные препараты, полученные из этих клеток, являются сравнительно однородными, не загрязненными другими мембранными элементами. Эритроцитарные мембраны относительно просто выделить, производя осмотический лизис красных кровяных клеток. Выделенные мембраны эритроцитов («тени») сохраняют большинство свойств мембран нативных клеток, в частности, они способны восстанавливать барьерные свойства, что является весьма важным при изучении транспортных процессов. Как известно, обеспечение переноса кислорода и CO_2 между легкими и тканями организма является основной функцией эритроцитов. В процессе гипотонического гемолиза эритроцитов можно ввести внутрь «теней» различные вещества, действие которых в последующем исследовать. Таким образом, однородность мембранного препарата и легкость его получения с сохранением нативных свойств делают эритроцитарные мембраны удобным объектом исследования. По этой причине «тени» широко используются в качестве

удобной естественной модели для изучения общих структурно-функциональных характеристик биомембран.

Основными компонентами эритроцитарных мембран, как и других биологических мембран, являются белки, липиды и углеводы. Углеводы химически связаны либо с белками (гликопротеины), либо с липидами (гликолипиды). Состав эритроцитарных мембран зависит от метода их выделения. Существует ряд методов получения безгемоглобинового препарата «теней» эритроцитов, включающих на первой стадии лизис клеток с помощью достаточно жестких воздействий, таких как диэлектрический пробой мембраны, обработка ультразвуком, лизис клеток водой и др. Затем осуществляют промывку мембран в водно-солевых растворах разной тоничности.

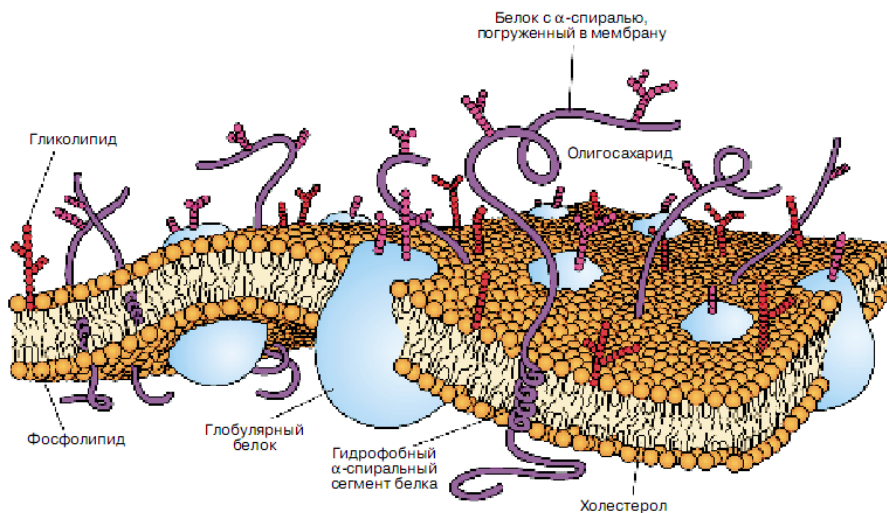


Рис. 1.6. Модель биологической мембраны

Такие методы выделения приводят к разрушению мембран на мелкие фрагменты с последующей их везикуляцией. Наиболее «мягким» способом выделения эритроцитарных «теней» является метод, в котором используется осмотический гемолиз и отмывка мембран в гипотоническом буфере (метод Доджа). Тени эритроцитов, полученные путем гипоосмотического гемолиза и отмытые от гемоглобина в гипотоническом буфере, содержат около 50 % белков, 43 % липидов и 7 % углеводов. Основная часть углеводов (93 %) связана с белками, остальная – с липидами. Отношение белков к липидам составляет величину 1,1 (например, для миэлина это отношение равно 0,23, а для внутренней мембраны митохондрий – 3,2). Масса одной эритроцитарной мембраны составляет $1,1-1,2 \cdot 10^{-14}$ г, толщина – около 6 нм.

Механизм осмотического гемолиза эритроцитов

Известно, что содержание белков в эритроцитах выше, а низкомолекулярных веществ – ниже, чем в плазме крови. Онкотическое давление, обусловленное белками плазмы, не в полной мере уравнивается осмотическим давлением, создаваемым градиентом концентрации низкомолекулярных веществ. Избыточное давление снаружи клетки формирует специфическую форму эритроцита в виде двояковогнутого диска, таким образом, уменьшая ограниченный мембраной внутриклеточный объем. Эритроциты в форме двояковогнутого диска имеют высокое отношение площади поверхности к объему (S/V). Объем эритроцита равен 87 мкм^3 , а площадь поверхности $S = 163 \text{ мкм}^2$, т. е. объем эритроцита оказывается меньше максимально возможного для данной величины площади его поверхности. Наличие «резервной» площади поверхности клеток позволяет им легко претерпевать разнообразные изменения формы. Поэтому при понижении тоничности омывающего раствора внеклеточная вода, поступая внутрь, вызывает увеличение объема эритроцита, и *дискоцит* превращается в *сфероцит*, при этом радиус его остается неизменным. При достижении гемолитического объема (146 % от объема дискоцита) наступает стадия гемолиза – выход гемоглобина в окружающую среду.

Смещение интегральной кривой на начальном этапе гемолиза вниз от нулевой линии (рис. 1.7) вызвано повышением интенсивности рассеяния света суспензией эритроцитов в результате их сферуляции. Линейный участок S-образной кривой отражает кинетику гемолиза основной массы эритроцитов. Плато на кривой означает, что гемолиз окончен, т. е. все эритроциты гемолизированы.

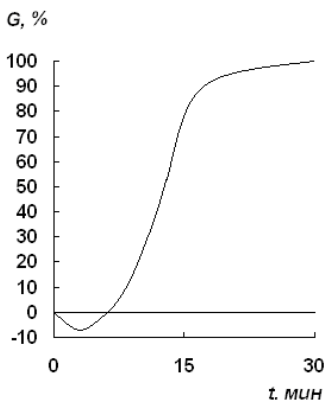


Рис. 1.7. Интегральная кривая осмотического гемолиза эритроцитов. На оси абсцисс указано время гемолиза, на оси ординат – степень гемолиза эритроцитов

При осмотическом гемолизе эритроцитов диффундирует только свободная фракция внутриклеточного гемоглобина. Осмотический тип гемолиза не

приводит к серьезным нарушениям структуры мембраны. Мелкие дефекты, образовавшиеся в ходе гемолиза, не приводят к нарушению целостности клеточной мембраны, что указывает на ее способность к самовосстановлению.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип метода центрифугирования?
2. Чем отличается аналитическое центрифугирование от препаративного?
3. Какие существуют разновидности метода центрифугирования в градиенте плотности? Назовите и охарактеризуйте каждый из них.
4. Что такой «градиент плотности»? Виды градиентов плотности.
5. В чем особенность метода дифференциального центрифугирования?
6. Особенность строения эритроцита?
7. Какие функции выполняют эритроциты?
8. Какие особенности эритроцитов свидетельствуют об их высокой специализации?
9. Виды гемолиза эритроцитов?
10. Что такое осмотический гемолиз, стадии осмотического гемолиза?
11. Обоснуйте критерии выбора метода гипосмотического гемолиза для получения осмотически интактных эритроцитарных мембран.
12. Химический состав эритроцитарных мембран.
13. Почему эритроцитарные «тени» являются удобным модельным объектом исследования?
14. Почему для осаждения эритроцитов и эритроцитарных мембран применяют разные условия центрифугирования?

Литература

1. Dodge, J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of erythrocytes / J. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – Vol.100, N 1. – P. 119–130.
2. Черницкий, Е. А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981.
3. Конев, С. В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы / С. В. Конев. – Минск: Наука и техника, 1987.
4. Геннис, Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функция / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997.
5. Биологические мембраны. Методы / под ред. Дж. Финдлея, Э. Уванза. – М.: Мир, 1990.
6. Методы практической биохимии / под ред. Б. Уильямс, К. Уилсон. – М.: Мир, 1978. – 260 с.
7. Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов [и др.]. – Воронеж, 2001. – 224 с.
8. Современные методы биофизических исследований / под ред. А. Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1988.

Задание 1 Выделение эритроцитов

Эритроциты выделяют из донорской крови путем отделения их от плазмы посредством центрифугирования.

1.1. Охлажденную цельную донорскую кровь вносят в центрифужные пробирки, пробирки попарно уравнивают.

1.2. Центрифужные пробирки помещают в охлажденный до 4 °С ротор и центрифугируют 5 мин. при 3000 g (5000 об/мин.) в центрифуге Avanti J-30 I для осаждения клеточных элементов.

1.3. Осторожно с помощью пипетки удаляют плазму и верхний слой лейкоцитов (рис. 1.8).

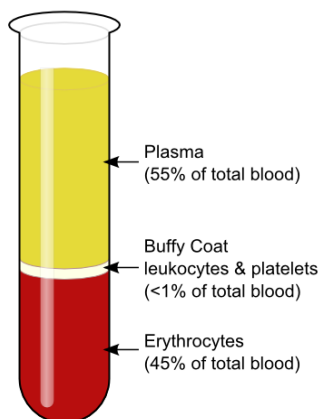


Рис. 1.8. Разделение компонентов крови при центрифугировании

1.4. Оставшуюся эритроцитарную массу (нижний слой) в соотношении 1:1 смешивают с охлажденным 155 мМ NaCl. Осторожно перемешивают полученную смесь, пробирки уравнивают и центрифугируют в тех же условиях.

1.5. Процедуру отмывки эритроцитов в 155 мМ NaCl повторяют трижды, пересажая суспензию при 5000 об/мин. в течение 5 мин.

Задание 2 Выделение мембран эритроцитов

Цитоплазматические мембраны эритроцитов получают с помощью гипосмотического гемолиза с последующим их выделением посредством центрифугирования. Для этого:

2.1. Отмытые эритроциты помещают в гипотонический 10 мМ раствор Na-фосфатного буфера pH 7,4 в соотношении 1:10 (температура буфера не должна превышать 4 °С).

2.2. Гемолиз эритроцитов проводят в течение 30 мин. при 4 °С, периодически перемешивая суспензию.

2.3. По окончании гемолиза «тени» эритроцитов осаждают центрифугированием в течение 15 мин. при 20 000 g (14 000 об/мин.). Супернатант осторожно отделяют от осадка.

2.4. Для удаления оставшейся свободной фракции гемоглобина осадок трижды промывают тем же буфером, переосаждая его при 14 000 об/мин. в течение 15 мин.

2.5. Конечный осадок эритроцитарных мембран ресуспендируют в изотоническом 155 мМ растворе NaCl в соотношении 1:1.

Полученный препарат эритроцитарных мембран хранят при температуре не выше 4 °С. В экспериментах, направленных на изучение свойств «тени» эритроцитов, необходимо использовать только свежеприготовленные суспензии мембран.

Оформление работы

К занятию:

1. Кратко законспектировать теоретические данные по лабораторной работе.

Во время занятия:

2. Описать этапы работы.

3. Оформить результаты проведения экспериментов.

4. Сделать выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Тема:	Исследование оптических свойств биополимеров методом спектрофотометрии
Цель:	Освоить спектрофотометрический метод исследования биологических объектов. Изучить оптические свойства белковых препаратов, модифицированных различными воздействиями

Оборудование и материалы

- Спектрофотометр Solar PV 1251 B
- Спектрофотометр UV-VIS-2501 PC «Shimadzu»
- рН-метр
- Пипетки автоматические
- Пипетки стеклянные
- Термостат
- Ртутный термометр 0–100 °С
- Фильтровальная бумага
- Кюветы
- Пробирки
- Штативы для пробирок

Реактивы

- Хлорид натрия (NaCl), 155 мМ (изотонический) раствор
- Раствор оксигемоглобина в 155 мМ растворе NaCl
- Раствор триптофана (10^{-5} М)
- Глутаровый альдегид, 2,5 %-ный раствор
- Додecilсульфат натрия (SDS), 0,5 %-ный раствор
- Мочевина, 8 М раствор
- NaOH, 1 М раствор
- Суспензия эритроцитарных мембран в 155 мМ растворе NaCl
- Вода дистиллированная

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Закономерности поглощения света веществом

Методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения анализируемыми веществами, составляют обширную группу *абсорбционных оптических методов* (от англ. *absorbance* – поглощаемость). Длины волн, при которых происходит поглощение, и степень поглощения зависят от структуры и от окружения макромолекулы, поэтому *спектроскопия по-*

глощения, или *абсорбционная спектроскопия*, может служить полезным инструментом для характеристики макромолекул. При поглощении света атомы и молекулы анализируемых веществ переходят в новое возбужденное состояние. Возбужденная молекула обладает набором дискретных квантованных энергетических состояний, называемых *энергетическими уровнями* молекулы.

Свет, или оптическое излучение, представляет собой волны электромагнитного поля. Световые волны являются плоскопоперечными, они распространяются перпендикулярно направлению электрического и магнитного полей (рис. 2.1).

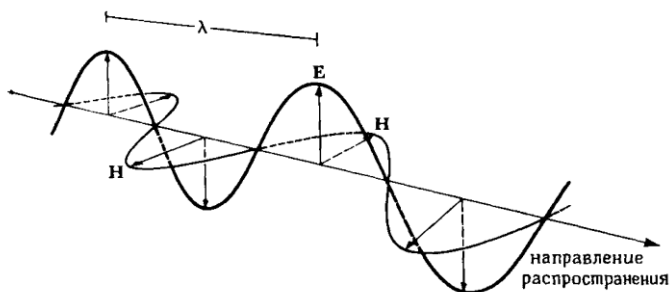


Рис. 2.1. Распространение электромагнитной волны. Векторы E (электрический) и H (магнитный) всегда взаимно перпендикулярны

Основными характеристиками светового излучения являются:

- *частота колебаний* – величина, равная числу полных колебаний напряженности электромагнитного поля, совершаемых в единицу времени (в 1 с);
- *длина волны* – расстояние, на которое распространяется в данной среде фронт монохроматической световой волны за один период световых колебаний;
- *волновое число* – величина, обратная длине волны.

В фотометрических методах используют избирательное поглощение света молекулами анализируемого вещества. При поглощении света атомы и молекулы анализируемых веществ переходят в новое возбужденное состояние. Возбужденная молекула обладает набором дискретных квантованных энергетических состояний, называемых *энергетическими уровнями* молекулы (см. рис. 2.2).

Согласно квантовой механике, свет представляет собой поток частиц, называемых *квантами*, или *фотонами*. Энергия каждого кванта определяется длиной волны излучения. В результате поглощения излучения молекула поглощающего вещества переходит из основного состояния с минимальной энергией E_1 в более высокое энергетическое состояние E_2 . Электронные переходы, вызванные поглощением строго определенных квантов световой энергии, характеризуются наличием строго определенных полос поглощения

в электронных спектрах поглощающих молекул. При этом поглощение света происходит только в том случае, когда энергия поглощаемого молекулой кванта совпадает с разностью энергий между квантовыми энергетическими уровнями E_2 и E_1 поглощающей свет молекулы – ΔE :

$$h\nu = \Delta E = E_2 - E_1,$$

где h – постоянная Планка ($h = 6,625 \times 10^{-34}$ Дж·с); ν – частота поглощаемого излучения, которая определяется энергией поглощенного кванта и выражается отношением скорости распространения излучения c (скорости световой волны в вакууме $c = 3 \times 10^{10}$ см/с) к длине волны λ ; $\nu = c/\lambda$. Частота излучения ν измеряется в обратных секундах (с^{-1}), герцах (Гц): $1 \text{ Гц} = 1 \text{ с}^{-1}$. Длина волны λ измеряется в ангстремах ($1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-8}$ см), микрометрах или микронах ($1 \text{ мкм} = 1 \text{ мк} = 1 \times 10^{-6}$ м), нанометрах или миллимикронах ($1 \text{ нм} = 1 \text{ мкм} = 10 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-9}$ м).

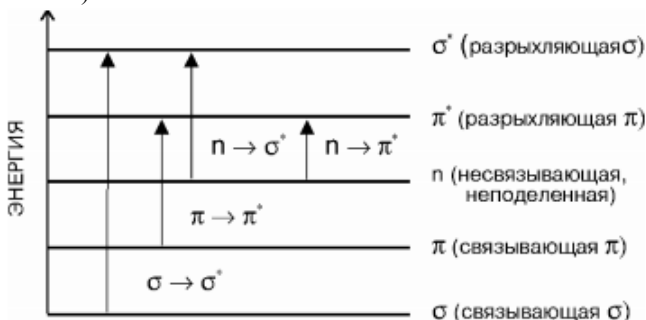


Рис. 2.2. Схема молекулярных электронных уровней и возможные электронные переходы при поглощении света

Для характеристики участка спектра часто используют также *волновое число* θ , которое показывает, какое число длин волн приходится на 1 см пути излучения в вакууме. Величина волнового числа определяется соотношением: $\theta = 1/\lambda$. Природа полос поглощения в ультрафиолетовой (10–400 нм) и видимой (400–750 нм) областях спектра одинакова и связана главным образом с числом и расположением электронов в поглощающих молекулах и ионах. В инфракрасной области (750 нм и выше) она в большей степени связана с колебаниями атомов в молекулах поглощающего вещества.

Различают три основные спектральные области оптического излучения: инфракрасная (ИК – от 750 до 2500 нм), видимая (400–750 нм) и ультрафиолетовая (УФ – от 10 до 400 нм). Дополнительно в УФ-области спектра выделяют следующие диапазоны: вакуумный (ВУФ) – 10–200 нм, коротковолновый (КУФ) – 200–280 нм, средневолновый (СУФ) – 280–315 нм и длинноволновый ультрафиолет (ДУФ) – 315–400 нм. В медицине принято разделение УФ-излучения на УФ-А, УФ-В, УФ-С диапазоны (ДУФ, СУФ и КУФ соответственно).

В простой молекуле способен возбуждаться любой электрон. Требуемая для этого энергия зависит, прежде всего, от типа занимаемой им орбитали. Из схемы, представленной на рис. 2.2, видно, что для возбуждения электрона на σ -орбитали необходима наиболее высокая энергия. Следовательно, труднее всего возбудить электроны в таких простых органических молекулах, как насыщенные углеводороды. Единственными доступными электронами у них являются электроны σ -связей, и для перехода электрона σ -связи на разрыхляющую σ^* -орбиталь необходимо поглощение большого количества энергии. Так, переход $\sigma \rightarrow \sigma^*$ для метана, соединения с одинарными связями между атомами, соответствует поглощению при $E > 600$ кДж/моль. Это количество энергии может дать электромагнитное излучение в УФ-диапазоне при $\lambda \approx 122$ нм.

Меньшему значению энергии соответствует переход на разрыхляющие π^* -орбитали. Известно, что молекулы большинства веществ, поглощающих свет в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра, обладают системой сопряженных двойных связей, например, углерод-углеродная двойная связь $C = C$, которая может рассматриваться как π -связь. Переход электрона со связывающей π -орбитали на разрыхляющую π^* -орбиталь достигается значительно легче, чем переход $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Меньшее количество энергии, которое при этом необходимо, может быть обеспечено УФ-излучением при $\lambda \approx 162$ нм (например, для этилена $CH_2 = CH_2$).

Наряду с системой сопряженных двойных связей многие поглощающие электромагнитное излучение молекулы имеют в своем составе гетероатомы, такие как атомы кислорода (например, карбонильная группа $>C = O$ пептидных связей белков) или азота (индольное кольцо триптофана), входящие в систему сопряженных связей или непосредственно примыкающие к ней (n -орбитали). На рис. 2.2 видно, что энергия верхних заполненных электронных уровней у неподеленных электронов (т. е. электронов, не участвующих в образовании химических связей) таких гетероатомов значительно превышает не только энергию σ -электронов, образующих одинарные связи между атомами (σ -орбитали), но и энергию заполненных орбиталей сопряженных двойных связей (π -орбитали). Переход несвязывающего неспаренного n -электрона при поглощении фотона может происходить на разрыхляющую σ^* -орбиталь. Переход $n \rightarrow \sigma^*$ требует еще меньших затрат энергии. Полосы, вызванные этим переходом, расположены в диапазоне длин волн λ , равных 200–300 нм. Из приведенной на рис. 2.2 схемы видно, что наименьшее количество энергии необходимо для $n \rightarrow \pi^*$ -перехода. Длина волны максимума полосы поглощения $n \rightarrow \pi^*$ -перехода карбонильной группы $>C = O$ соответствует примерно 280 нм.

Именно переходы $\pi \rightarrow \pi^$ и $n \rightarrow \pi^*$ встречаются в молекулах соединений с сопряженными связями и молекулах ароматических соединений.*

Переход электрона в возбужденное состояние на более высокий энергетический уровень происходит чрезвычайно быстро ($\sim 10^{-15}$ с). В течение

этого времени более тяжелые атомные ядра не успевают сколько-нибудь заметно переместиться. Следовательно, во время переходов электрона положения ядер (межъядерное расстояние) практически не меняются (*принцип Франка–Кондона*).

Взаимодействие света с веществом описывается рядом законов, основными из которых являются:

1. *Закон Гротгуса–Дрейпера*: химически активным является излучение с такими длинами волн, которые поглощаются веществом. Этот закон не имеет исключений.

2. *Закон Вант–Гоффа*: количество химически модифицированного светом вещества прямо пропорционально количеству поглощенной веществом энергии света.

3. *Закон Бугера–Ламберта–Бера для монохроматического света*: однородные слои одного и того же вещества одинаковой толщины поглощают одну и ту же долю падающей на них световой энергии (при постоянной концентрации растворенного вещества). Математически этот закон выражается уравнением экспоненциальной зависимости:

$$I = I_0 e^{-\epsilon c l},$$

где ϵ – молярный коэффициент экстинкции (поглощения); c – концентрация вещества (моль/л); l – длина оптического пути (толщина слоя вещества) (рис. 2.3).

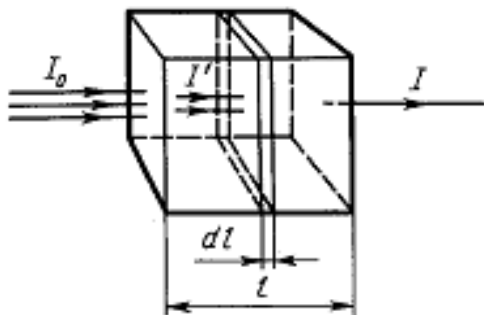


Рис. 2.3. Схема, поясняющая закон Бугера–Ламберта–Бера

Коэффициент экстинкции характеризует способность молекул вещества поглощать свет определенной длины волны и зависит от структурных особенностей молекул данного вещества.

Закон Бугера–Ламберта–Бера выведен для достаточно разбавленных растворов при использовании монохроматического света. Значительные отклонения от закона могут быть обусловлены:

- свойствами анализируемого образца, способностью молекул вещества при больших концентрациях образовывать агрегаты, что приводит к росту светорассеяния и кажущемуся повышению его оптической плотности;

- конструкцией прибора – использование немонахроматического пучка света, работа в области, где погрешности прибора максимальны.

Для характеристики поглощающей способности вещества используют такие величины, как оптическая плотность, светопропускание и светопоглощение.

Оптическая плотность (D) – это десятичный логарифм отношения интенсивности света, падающего на образец (I_0), к интенсивности света, выходящего из образца (I):

$$D = \lg I_0/I.$$

Оптическая плотность является безразмерной величиной.

Светопропускание (T) – отношение интенсивности света, вышедшего из образца, к интенсивности света, падающего на образец:

$$T = I/I_0.$$

Светопропускание не зависит от интенсивности света, но зависит от длины волны и может служить характеристикой данного образца. Светопропускание измеряется в процентах.

Светопоглощение – величина, равная $1 - T$; измеряется в долях или процентах.

Важнейшим следствием из закона Бугера–Ламберта–Бера является следующее положение: *оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации данного вещества*:

$$D = \epsilon c l,$$

где ϵ – молярный коэффициент экстинкции (поглощения).

Раствор с концентрацией 1 моль/л в кювете толщиной в 1 см имеет оптическую плотность D, равную ϵ . Молярный коэффициент поглощения зависит от длины волны падающего света, природы растворенного вещества, температуры раствора и не зависит от условий измерения. Поэтому ϵ характеризует способность молекул данного вещества поглощать свет той или иной длины волны, т. е. является индивидуальной характеристикой поглощательной способности вещества при данной длине волны. Размерность молярного коэффициента экстинкции $\epsilon - \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

При графическом изображении зависимости оптической плотности от концентрации (при постоянном значении l) получается прямая линия. Эта прямая проходит через начало координат при отсутствии поглощения растворителем или других погрешностей. Отклонения от закона Бугера–Ламберта–Бера могут быть вызваны и посторонними веществами, присутствующими в растворе.

Измерив оптическую плотность раствора в кювете толщиной 1 см (точнее, в кювете с длиной оптического пути, равной 1 см), по значению молярного коэффициента экстинкции можно определить концентрацию раствора (моль/л):

$$c = D/\epsilon.$$

Поглощение света осуществляется не всей молекулой, а определенными ее участками – *хромофорами*. Хромофоры – это отдельные химические группы только одного типа атомов в молекуле вещества, поглощающие кванты света в УФ- и видимой областях спектра. Основными хромофорами в белках являются пептидные группы, ароматические аминокислоты и цистеин. Все они поглощают в УФ-области спектра. В нуклеиновых кислотах основными хромофорами являются пуриновые и пиримидиновые азотистые основания нуклеотидов, поглощающие в диапазоне длин волн 255–270 нм.

Хромофорами сложных белков, в частности, гемопротеидов, в видимой области является гем. Так, благодаря железопорфиру в составе белка раствор оксигемоглобина обнаруживает несколько максимумов поглощения в этой области спектра: самый значительный (интенсивный) в области 412–414 нм (полоса *Soret*), принадлежащей порфириновой части молекулы, и максимумы меньшей интенсивности при 540 и 575 нм.

Однокомпонентные неокрашенные белки (сывороточный альбумин, пепсин, трипсин, глобулины и др.) не поглощают свет с длинами волн 400–700 нм.

С помощью спектральных методов, измеряя оптическую плотность, можно получить следующую информацию:

- используя следствие из закона Бугера–Ламберта–Бера, рассчитать концентрацию вещества в растворе;
- построить спектр поглощения вещества;
- анализируя спектр поглощения, сделать выводы о структурном состоянии биомолекул, т. к. изменение структуры биополимеров отражается на их оптических свойствах.

Спектры поглощения

Спектр поглощения, или, более корректно, *абсолютный спектр поглощения вещества*, представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Такие спектры для красителей в видимой области (400–700 нм) имеют иногда несколько максимумов. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм) и видимых областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле. *Это обычно делокализованные π -электроны двойных $C = C$ связей (связанные) и n -электроны неподеленных пар гетероатомов (азота, кислорода, серы, фосфора)*. Причем, можно отметить следующую особенность: чем длиннее система сопряженных двойных связей в молекуле, т. е. чем сильнее делокализованы по молекуле π -электроны, тем при большей длине волны располагается спектр поглощения.

Спектры поглощения биологически важных веществ представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами. У атомов и простых молекул в газовой фазе спектры поглощения линейчатые.

Поскольку, как правило, все электроны в молекуле при комнатной температуре находятся на нижнем энергетическом уровне, спектры в этой об-

ласти дают информацию об основном и первом возбужденном электронных состояниях молекулы.

Ввиду того, что длина волны поглощенного света соответствует определенному переходу, пики на спектрах поглощения вещества обусловлены присутствием в нем известных структур. Длина волны, при которой наблюдается максимальное поглощение света, обозначается $\lambda_{\text{макс}}$. Положение максимума спектра поглощения является важной оптической характеристикой вещества, а характер и вид спектра поглощения характеризуют его качественную индивидуальность. Спектр поглощения является индивидуальной характеристикой вещества и определяется в первую очередь химической структурой молекулы. Однако $\lambda_{\text{макс}}$ и ϵ проявляют некоторые изменения в зависимости от того, в какой среде исследуется образец. На положение максимума спектра поглощения и значение молярного коэффициента поглощения оказывает влияние pH среды, полярность растворителя, присутствие в растворе других молекул и др. Именно эти факторы лежат в основе использования абсорбционных методов для характеристики макромолекул. Соответственно, группа в молекуле вещества, которая определяет максимальный вклад в спектр ее поглощения, и называется хромофором. Такой группой является, например, карбонильная группа $>C=O$, присутствующая у всех аминокислот. К основным хромофорам белка относятся остатки ароматических кислот: триптофан и в меньшей степени тирозин и фенилаланин. На рис. 2.4 представлены спектры поглощения ароматических аминокислот.

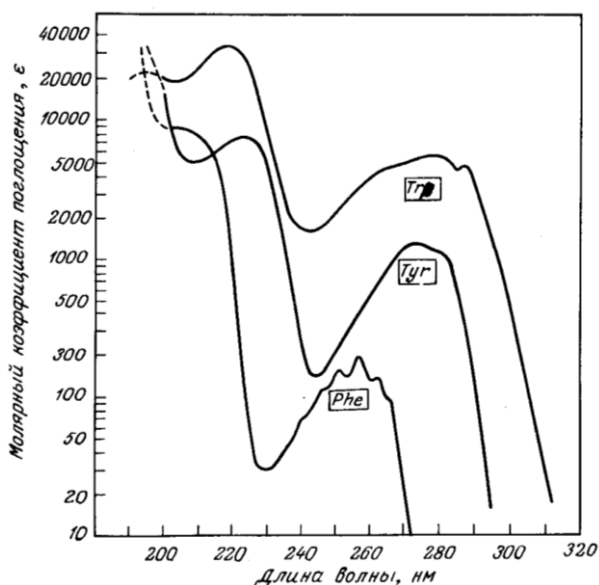


Рис. 2.4. Спектры поглощения ароматических аминокислот

Спектр поглощения триптофана, обусловленный его индольным кольцом с системой сопряженных связей, обладает двумя полосами поглощения с максимумами при 220 и 280 нм. При образовании сопряженных связей в молекуле энергия возбужденного состояния электронов может уменьшаться, и, следовательно, хромофор начинает поглощать свет большей длины волны. Такой сдвиг в спектрах поглощения называется *батохромным*. Наоборот, сдвиг спектра в коротковолновую область именуется *гипохромным*. Гиперхромный и гипохромный эффекты – это соответственно увеличение и уменьшение экстинкции. Гипохромный эффект, например, используется для оценки степени спиральности (упорядоченности) белков.

Обнаружить очень близко расположенные линии колебательных и вращательных переходов в спектрах молекул удастся лишь при высоком разрешении (разрешением называется способность прибора различать две близко расположенные линии). Кроме остатков ароматических аминокислот в общий спектр поглощения белка вносят вклад и другие хромофорные группировки. В области спектра 220–255 нм поглощают серосодержащие аминокислоты – цистеин, цистин, метионин. В области спектра 190 нм – пептидные группы белковой молекулы.

Полосы поглощения белков, и особенно полоса при 280 нм, чувствительны к разнообразным влияниям, которые действуют на π -электроны ароматических аминокислот. К ним относятся – различные типы комплексообразования, ионные и дипольные взаимодействия, образование водородных и иных связей. Анализ спектральных характеристик белковых образцов дает возможность получить надежную информацию о состоянии белковой молекулы в норме, в условиях различного микроокружения, при действии физико-химических агентов, а также при развитии в организме патологических процессов и пр.

Спектрофотометрический метод – один из наиболее распространенных методов исследования в биологии. В биологических исследованиях чаще всего используются спектрофотометры (СФ) и фотоэлектроколориметры (ФЭК). Для выделения участка спектра или отдельных длин волн в спектрофотометрах используют, как правило, призмы или дифракционные решетки.

Принципиальная схема современных спектрофотометров включает в себя несколько блоков (рис. 2.5):



Рис. 2.5. Схема устройства спектрофотометра: источник света (Л); монохроматор (М); кювета с образцом (К); фотоэлемент – чаще всего используется фотоэлектронный умножитель (ФЭУ); блок усилителя фототока (У); регистрирующее устройство (П, С)

Световой пучок от источника света попадает в монохроматор через входную щель и разлагается дифракционной решеткой или призмой в спектр. *Монохроматор* – это оптическая система, выделяющая из всего спектра источника света излучение определенной длины волны. Это обычно призмы, по-разному преломляющие свет разных длин волн, или дифракционные решетки. В видимой области используются обычные стеклянные призмы, но в ультрафиолетовой области они не годятся, поскольку стекло начинает поглощать при $\lambda < 400$ нм, поэтому призмы делают из кварца. Далее монохроматический пучок света проходит через кювету и его интенсивность измеряют приемником света ФЭУ. Фототок подается на вход усилителя, затем сигнал преобразуется в специальном электронном блоке (II) и подается на регистрирующее устройство, где электрический сигнал регистрируется.

В монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводятся контрольный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через кювету, попадает на фотоэлемент, который преобразовывает световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется.

Структура и оптические свойства гемоглобина

Гемоглобин человека представляет собой важнейший транспортный белок крови, уникальная функция которого заключается в переносе кислорода от легких к тканям и углекислого газа и протонов обратно от тканей к легким. Гемоглобин является основным компонентом эритроцитов. В одной красной кровяной клетке содержится около 280–340 млн молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из 10 тыс. атомов водорода, углерода, азота, кислорода, серы и железа. Установлено, что гемоглобин человека представляет собой олигомерный (тетрамерный) белок, состоящий из двух пар неидентичных по аминокислотным последовательностям α - и β -цепей, в состав которых входит 141 и 146 аминокислотных остатков соответственно.

В поддержании вторичной структуры гемоглобина участвует множество водородных связей, обеспечивающих формирование α -спирализованных участков. В частности, для α -субъединиц характерно наличие семи α -спирализованных участков, обозначаемых символами А, В, С, Е, F, G, H, а также восьми неспирализованных: NA, AB, BC, CE, EF, FG, GH, HC. Субъединицы β имеют в своем составе восемь α -спирализованных участков А, В, С, D, Е, F, G, H и девять неспирализованных: NA, AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH, HC. Каждая из субъединиц апоглобина формирует специфический гидрофобный карман, содержащий простетическую группу – гем, который представляет собой комплекс протопорфирина IX с атомом Fe^{2+} в центре (рис. 2.6).

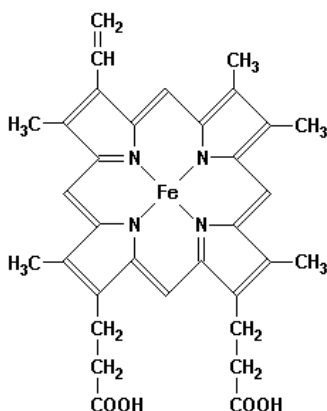


Рис. 2.6. Структура гема

Атом железа в составе гема может находиться либо в высокоспиновой (без лиганда), либо в низкоспиновой (в присутствии лиганда) ферро- (Fe^{+2}) -форме, образуя соответственно либо пять, либо шесть координационных связей. Четыре координационные связи образуются между двухвалентным железом и атомами азота пиррольных колец протопорфирина IX, пятая – с ϵ -азотом (Ne) имидазольного кольца проксимального гистидина F8 (His α 87 или His β 92). Шестая координационная связь образуется с молекулой кислорода (в оксигемоглобине), в дезоксигемоглобине лиганд отсутствует. К распространенным производным гемоглобина относятся также метгемоглобин и карбоксигемоглобин. В метгемоглобине железо в составе гема находится в трехвалентной ферри- (Fe^{+3}) -форме при этом шестое координационное положение в указанной форме гемопротеида занято водой. Гемоглобин обладает большим сродством к угарному газу (CO), переходя при взаимодействии с ним в карбоксигемоглобин, не обладающий способностью обратимо связывать кислород.

Олигомеризация α - и β -субъединиц с образованием тетрамерной молекулы (рис. 2.7) гемоглобина ($\alpha_2\beta_2$) происходит через промежуточную стадию димеризации ($\alpha\beta$) за счет формирования ван-дер-ваальсовых контактов и водородных связей между рядом аминокислотных остатков спиралей В, Н, G обеих субъединиц и, дополнительно, D-спирали β -субъединицы. При этом участок В-спирали одной субъединицы взаимодействует с участком Н-спирали другой, в то время как G-спирали обеих субъединиц взаимодействуют друг с другом. Ряд аминокислотных остатков, расположенных в начале D-спирали β -субъединицы, образуют дополнительные контакты с Н-спиралью α -субъединицы.

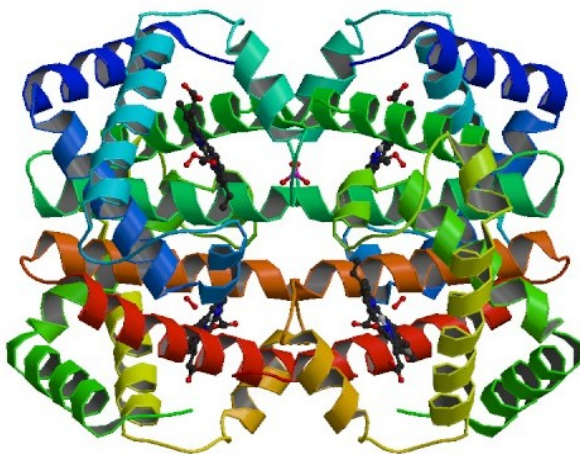


Рис. 2.7. Четвертичная структура молекулы оксигемоглобина человека (1hho.pdb)

При ассоциации субъединиц в четвертичную структуру внутри молекулы белка формируется центральная полость, имеющая форму цилиндра и направленная вдоль оси интерфейсов $\alpha_1\alpha_2$ и $\beta_1\beta_2$. Одна часть цилиндра проходит в области контакта α -субъединиц друг с другом и является наиболее узкой, вторая часть расположена в области контакта β -субъединиц. В гемоглобине человека N-концевые последовательности β -субъединиц, обращенные в центральную полость тетрамерной молекулы белка, содержат общий кластер из восьми положительных зарядов, представленных остатками Val NA1, His NA2, Lys EF6, His H21 в каждой β -цепи. Этот кластер представляет собой сайт связывания аллостерического регулятора гемоглобина человека – 2,3-дифосфоглицерата (2,3-DPG). Связывание 2,3-DPG обусловлено образованием ион-парных взаимодействий между отрицательно заряженным эффектором, имеющим при физиологическом значении pH практически четыре отрицательных заряда, и тремя положительно заряженными группами в каждой β -цепи белка (рис. 2.8).

В настоящее время стало понятным, почему 2,3-DPG снижает сродство гемоглобина к кислороду. Образуя перекрестные ион-парные взаимодействия с β -цепями, эффектор стабилизирует четвертичную структуру дезоксигемоглобина (так называемую Т-конформацию белка). Другими словами, 2,3-DPG сдвигает равновесие в сторону образования Т-конформации в ряду переходов $T \leftrightarrow R$, где R-конформация соответствует полностью оксигенированному гемоглобину.

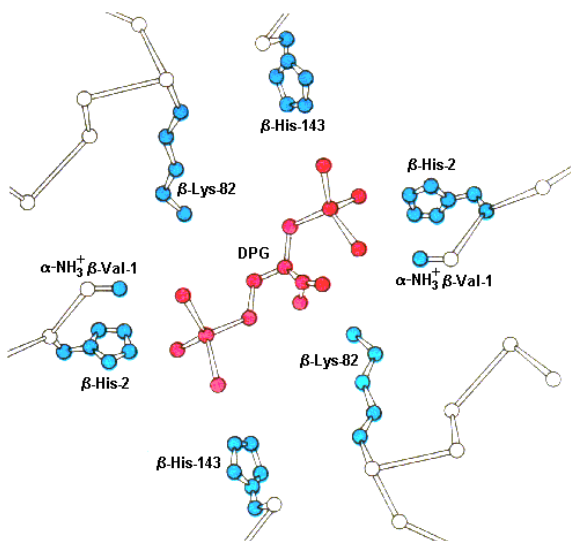


Рис. 2.8. Связывание 2,3-DPG с дезоксигемоглобином человека. 2,3-DPG электростатически взаимодействует с тремя положительно заряженными группами в каждой β -цепи белка (Arnone A., X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin, *Nature*, 1972. Vol. 237, № 5351. P. 146–149)

Присоединение и отдача кислорода молекулой гемоглобина сопровождается изменениями третичной структуры его субъединиц и четвертичной структуры гемопротейда в целом. Присоединив молекулу кислорода, гемоглобин переходит из дезоксисостояния (Т-формы) в оксигенированную R-форму.

Изменения электронной пространственной структуры гемоглобина в процессе оксигенации

Внешняя оболочка атома железа имеет электронную конфигурацию $3d^64s^2$ (рис. 2.9, 1). При образовании двухвалентного иона железа Fe^{2+} происходит удаление двух электронов с $4s$ -орбитали (рис. 2.9, 2), а при образовании Fe^{3+} еще одного электрона с $3d$ -орбитали (рис. 2.9, 3). Наличие четырех и пяти неспаренных электронов на $3d$ -орбиталях атома железа, расположенного в центре протопорфирина IX, настолько выгодно, что для сохранения этой конфигурации связывающие электроны четырех пиррольных колец занимают энергетически менее выгодную $4d$ -орбиталь (рис. 2.9, 4, 5). На рис. 2.10 дополнительно схематически показаны электронная структура железа гема, а также положение атома железа относительно плоскости порфиринового кольца гема.

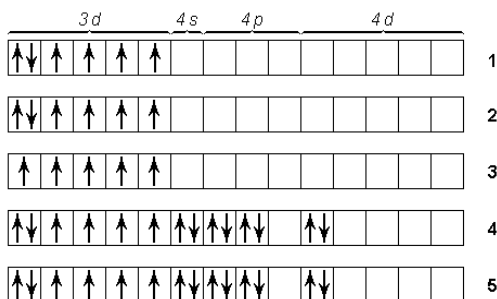


Рис. 2.9. Электронная структура атома железа гема

В молекуле дезоксигемоглобина железо отстоит от плоскости порфиринового кольца примерно на $0,5-0,6 \text{ \AA}$ (имеются незначительные отличия между α - и β -субъединицами). Из шести $3d$ электронов железа Fe^{2+} два электрона спарены на одной из нижних d -орбиталей (d_{xy} , d_{yz} , d_{xz}), а четыре электрона занимают оставшиеся d -орбитали, их спиновые моменты, согласно правилу Хунда, параллельны, и суммарный спин S равен 2. Спектр поглощения дезоксигемоглобина имеет в зеленой области характерную полосу с $\lambda_{\text{max}} \sim 555 \text{ нм}$ (рис. 2.10). Присоединение кислорода приводит к значительным структурным изменениям. Атом железа в оксигемоглобине лежит практически в плоскости порфиринового кольца (расстояние до плоскости составляет $0,16 \text{ \AA}$ в α - и $0,00 \text{ \AA}$ в β -субъединицах). Все шесть d -электронов спарены на трех нижних d -орбиталях, суммарный спин S равен 0, таким образом, оксигемоглобин диамагнитен. В зеленой области спектра поглощения оксигемоглобина имеются две характерные полосы с λ_{max} равной 575 и 540 нм.

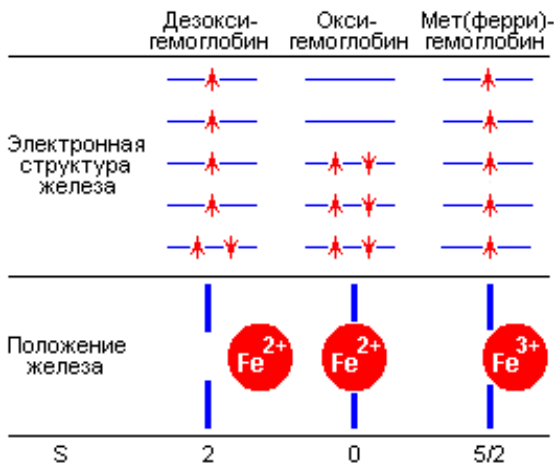


Рис. 2.10. Электронная структура железа гема и положение атома железа относительно плоскости порфиринового кольца гема

В ферригемоглобине (метгемоглобине) при нейтральных значениях pH место кислорода занимает молекула воды (при щелочных значениях pH – OH^-), железо находится значительно ближе к плоскости гема, чем в дезоксигемоглобине, все пять d -электронов не спарены и занимают пять d -орбиталей. $S = 5/2$.

Структурные изменения в активном центре (вблизи гема) гемоглобина приводят и к значительным изменениям пространственной структуры всего белка. При оксигенации (переход из T-состояния в R-состояние) смещение отдельных аминокислотных остатков достигает 7 \AA . Как уже было сказано выше, четвертичная структура гемоглобина характеризуется наличием двух α - и двух β -субъединиц, которые образуют $\alpha\beta$ -димеры. T→R-переход сопровождается поворотом одного димера относительно другого на $12\text{--}15^\circ$ и, в конечном счете, приводит к увеличению «размеров» гемовых карманов. Эти структурные изменения инициируются присоединением первой молекулы кислорода к одному из свободных гемов и распространяются на всю глобулу. В T-форме димеры «стягиваются» 14 дополнительными (по сравнению с R-формой) солевыми мостиками (водородные связи между ионными или нейтральными группами аминокислот, ван-дер-ваальсовы контакты).

Каждая форма гемоглобина характеризуется определенным спектром поглощения, представляющим собой зависимость оптической плотности раствора гемоглобина от длины волны света. Наиболее интенсивной полосой в спектре поглощения гемоглобина является полоса Soret, характеризующая порфириновую часть его молекулы (рис. 2.11). По изменению положения и интенсивности поглощения этой полосы, а также по наличию характерных полос поглощения в длинноволновой области спектра можно судить о структурных изменениях молекул различных форм гемоглобина. Считается, что полоса Soret соответствует отдельному электронному переходу, а полосы при 540 и 575 нм обусловлены колебательными переходами другого электронного уровня. Кроме того, в спектре поглощения отчетливо видны полосы поглощения с $\lambda_{\text{макс}} = 342 \text{ нм}$, принадлежащая также гему, и с $\lambda_{\text{макс}} = 275 \text{ нм}$ – ароматическим аминокислотным остаткам белковой части молекулы. В самой коротковолновой области спектра ($\lambda_{\text{макс}} = 190 \text{ нм}$) располагается полоса поглощения пептидной группы ($-\text{CO}-\text{NH}-$) белка – важнейшего элемента первичной структуры белковой молекулы (рис. 2.12).

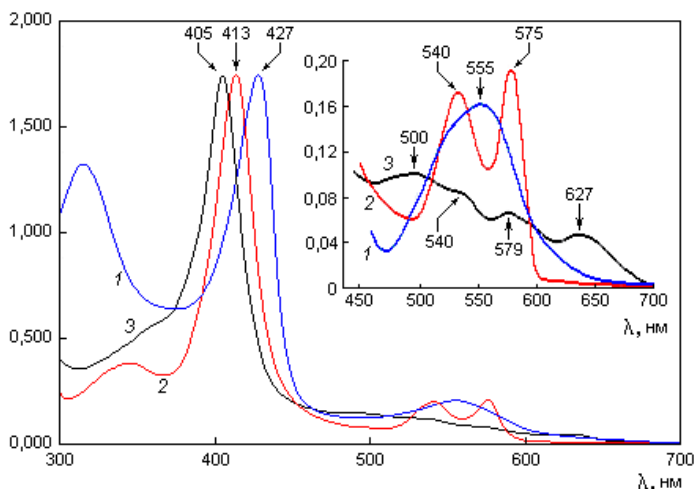


Рис. 2.11. Нормализованные абсолютные спектры поглощения дезоксигемоглобина (1), оксигемоглобина (2) и метгемоглобина (3). На вставке показана длинноволновая область в абсолютных спектрах поглощения дезоксигемоглобина (1), оксигемоглобина (2) и метгемоглобина (3). (Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam: North-Holland Pub. Comp., 1971. 762 p.)

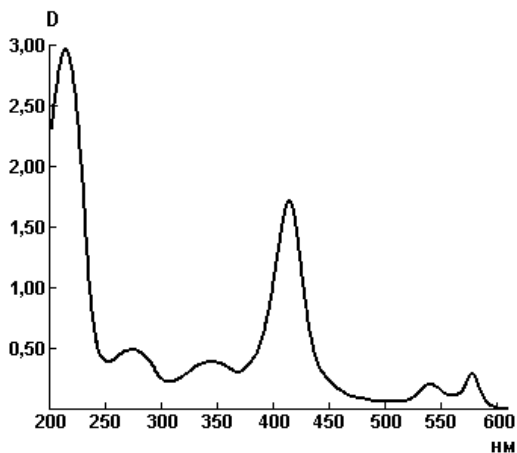


Рис. 2.12. Спектр поглощения водного раствора оксигемоглобина в УФ- и видимой областях спектра светового излучения

Анализ спектральных характеристик хромофоров белковых молекул дает возможность получить надежную информацию о состоянии молекул в норме, в условиях различного их микроокружения, при действии физико-химических агентов, при развитии в организме патологических процессов и пр.

Контрольные вопросы

1. Назовите условия, необходимые для того, чтобы произошло светопоглощение в биосистеме.
2. Какие основные характеристики светового излучения?
3. Что такое хромофор? Хромофоры белка.
4. Что такое спектр поглощения вещества, что он отражает?
5. Какими законами описывается поглощение света молекулами?
6. Почему после прогревания раствора белка меняются его оптические параметры?
7. Чем обусловлено изменение спектров поглощения молекул гемоглобина после обработки химическими агентами?

Литература

1. Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения / под ред. А. Б. Рубина. – М., 1987.
2. Рубин, А. Б. Биофизика (в 2-х томах) / А. Б. Рубин. – М.: Наука, 2004.
3. Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов [и др.]. – Воронеж, 2001. – 224 с.
4. Современные методы биофизических исследований / под ред. А. Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1988.
5. Конев, С. В. Фотобиология / С. В. Конев, И. Д. Волотовский. – Минск, 1979.
6. Артюхов, В. Г. Оптические методы анализа интактных и модифицированных биологических систем / В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева. – Воронеж, 1996.
7. Бенуэлл, К. Основы молекулярной спектроскопии / К. Бенуэлл. – М.: Мир, 1985.

ХОД РАБОТЫ

Задание 1	Определение концентрации гемоглобина в растворе с помощью калибровочной прямой
------------------	---

В качестве объекта исследования используются препараты гемоглобина и эритроцитарных мембран, полученные при выполнении лабораторной работы № 1.

- 1.1. Приготовить раствор гемоглобина (оксигемоглобина) в изотоническом растворе NaCl.
- 1.2. Измерить оптическую плотность опытного раствора при различных длинах волн в диапазоне длин волн 500–600 нм.
- 1.3. Построить спектр поглощения гемоглобина.
- 1.4. Определить длину волны в области, в которой оптическая плотность образца имеет наибольшую величину – максимум спектра поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$).

1.5. Приняв эталонный раствор гемоглобина за 1, приготовить следующие его разбавления: 0,5; 0,3; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025 долей от исходного раствора соответственно.

1.6. Измерить оптическую плотность при $\lambda_{\text{макс}}$ приготовленных растворов.

1.7. Полученные значения оптической плотности растворов гемоглобина условной концентрации занести в таблицу:

№ п/п	Концентрация (условная)	D	Концентрация (истинная), моль/л
1	1		
2	0,5		
3	0,3		
4	0,15		
5	0,1		
6	0,05		
7	0,025		

1.8. Используя выражение $D = \epsilon cl$ при $l = 1$ см и $\epsilon = 13,8 \times 10^3$ л (моль⁻¹·см⁻¹) для длины волны 541 нм, рассчитать истинные значения концентрации гемоглобина. Данные занести в таблицу.

1.9. Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс значения истинной концентрации эталонных растворов, а по оси ординат – оптической плотности (D).

1.10. По калибровочному графику определить концентрацию белка (гемоглобина) в предлагаемой пробе. В качестве предлагаемой пробы используется препарат эритроцитарных мембран, полученных на лабораторной работе № 1.

1.11. Измерить оптическую плотность исследуемого образца эритроцитарных мембран при длинах волн 576, 560, 540 нм соответственно.

1.12. Рассчитать концентрацию гемоглобина в предлагаемой пробе, определить погрешность значений, полученных двумя методами, используя формулу:

$$[\text{HbO}_2] = (1,64 \cdot D_{575} + 0,64 \cdot D_{560} + 0,72 \cdot D_{540}) / 10^4,$$

где $[\text{HbO}_2]$ – концентрация гемоглобина; D_{575} , D_{560} , D_{540} – значения оптической плотности исследуемого раствора гемоглобина при длинах волн 575, 560, 540 нм соответственно.

Сделать выводы о спектральных свойствах раствора гемоглобина и о возможности применения закона Бугера–Ламберта–Бера для определения концентрации веществ в растворе.

Задание 2	Изучение термоиндуцированных изменений в структуре молекулы гемоглобина методом спектрофотометрии
------------------	--

Для выполнения задания II данной лабораторной работы необходимы два термостата. В две высокие химические пробирки внести по 5 мл раство-

ра гемоглобина. Пробы, объемом 1 мл, по ходу опыта отбирают в отдельные пробирки в соответствии со следующей схемой проведения опыта:

Вариант 1. Растворы белка нагревают при 40 °С в течение 5, 10, 15, 30 мин.

Вариант 2. Растворы белка нагревают при 60 °С в течение 5, 10, 15, 30 мин.

Построить спектры поглощения термомодифицированных растворов гемоглобина, сравнить с нативным образцом (задание 1, пункт 1.3 настоящей лабораторной работы).

Сделать выводы об оптических свойствах растворов гемоглобина, модифицированных воздействием различных температур.

Задание 3	Изучение влияния различных химических агентов на структуру молекулы гемоглобина методом спектрофотометрии
------------------	--

Для проведения эксперимента взять пять пробирок, пронумеровать. В каждую пробирку налить по 1 мл раствора гемоглобина. В качестве модифицирующих агентов используются:

- 1) 0,5 %-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS);
- 2) 2,5 %-ный раствор глутарового альдегида;
- 3) 8 М раствор мочевины;
- 4) 1 н раствор NaOH;
- 5) 155 мМ NaCl (контрольная проба).

В соответствии с нумерацией пробирок к растворам белка добавить по 0,1 мл соответствующего химического агента. Перемешать содержимое и смеси проинкубировать в течение 10 мин. при комнатной температуре.

Построить спектры поглощения полученных растворов, сравнить со спектром контрольной пробы (проба № 5), описать изменения и сделать выводы.

Оформление работы

К занятию:

1. Кратко законспектировать теоретические данные по лабораторной работе.

Во время занятия:

2. Оформить наглядно практическую часть работы (таблицы, графики).
3. Охарактеризовать полученные результаты, сравнить спектры поглощения.
4. Сделать вывод о характере структурных изменений молекулы гемоглобина при воздействии различных факторов и о связи оптических свойств и структуры молекулы биополимера.

5. Записать в лабораторный журнал выводы, сделанные по результатам выполнения работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Тема:	Применение метода спектрофлуориметрии для исследования биологических систем
Цель:	Освоить спектрофлуориметрический метод исследования биологических объектов. Освоить метод флуоресцентного зондирования

Оборудование и материалы

- Спектрофлуориметр SFL 1211A
- Спектрофлуориметр RF-5301 PC «Shimadzu»
- Кювета кварцевая
- Пробирки стеклянные
- Штативы для пробирок
- Мерные стаканы на 25, 50 мл
- Пипетки автоматические
- Стеклянная палочка
- Водяная баня
- Ртутный термометр 0–100 °С
- Фильтровальная бумага

Реактивы

- Водные растворы триптофана, фенилаланина, тирозина (10^{-5} М)
- Сывороточный альбумин (0,001 М раствор)
- Эритроцитарные мембраны
- Флуоресцентный зонд 1,8-АНС
- Хлорид натрия (NaCl), 155 мМ (изотонический) раствор
- NaOH, 1 н раствор
- Глютаровый альдегид, 2,5 %-ный раствор
- Додецилсульфат натрия, 0,5 %-ный раствор
- Вода дистиллированная

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Флуоресцентная спектроскопия. Общие закономерности, лежащие в основе флуоресцентной спектроскопии

В лабораторной работе № 2 было показано, что спектры поглощения позволяют получать различного рода информацию о свойствах макромолекул и их взаимодействиях с другими молекулами. Возможность получения такой информации основана на том, что спектры поглощения молекулы, со-

держщей хромофор, в значительной степени зависят от ее химической структуры и внешнего окружения.

Фотопроцессы в биологических системах начинаются с поглощения света хромофором исследуемого объекта и сопровождаются возникновением электронновозбужденного состояния, характеризующегося определенной энергией, временем жизни, структурными свойствами. Через какое-то непродолжительное время молекула теряет избыток энергии и возвращается в исходное состояние. Одним из способов дезактивации электронно-возбужденного состояния (перехода в исходное) является *флуоресценция*. *Флуоресценция – это физический внутримолекулярный процесс, в результате которого молекула за время, составляющее 10^{-8} – 10^{-9} с, переходит в основное состояние с испусканием кванта света.* Как и в случае поглощения, здесь реализуется принцип Франка–Кондона. Поскольку по сравнению с поглощением испускание света происходит в течение более длительного времени, в структуре биомолекулы за этот период может произойти ряд изменений. Эти структурные перестройки оказывают влияние на параметры флуоресценции системы, которые позволяют получить информацию об ее электронновозбужденных состояниях.

Полная энергия состояния молекулы E складывается из энергии электронного возбуждения E_e , колебательной энергии E_v и вращательной энергии E_r . Таким образом, при поглощении кванта света полное изменение энергии молекулы можно представить следующим образом:

$$h\nu = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r, \text{ при этом } E_e \gg E_v > E_r.$$

Поглощение и испускание света хорошо иллюстрирует диаграмма уровней энергии, предложенная Яблонским (рис. 3.1).

При поглощении кванта света молекулой осуществляется переход с самого нижнего колебательного подуровня основного состояния на возбужденные уровни S_1 , S_2 или S_n , которые также характеризуются своими колебательными и вращательными подуровнями. Термин «синглетные уровни» указывает на то, что спин электрона при поглощении фотона и переходе на более высокий энергетический уровень не изменяется. При переходе между уровнями S_0 , S_1 , S_2 спины электронов также не изменяются. В молекулах большинства соединений при возбуждении электронных состояний, расположенных выше первого синглетного возбужденного состояния S_1 , происходит быстрая *внутренняя конверсия* (со временем порядка 10^{-13} с). Внутренняя конверсия – это отдача избытка электронной и колебательной энергии окружающей среде безызлучательным путем из-за соударений с молекулами растворителя. Внутренняя конверсия осуществляется за счет перехода электрона с нижнего колебательного подуровня верхнего состояния S_n на верхний колебательный подуровень состояния S_1 с последующей *релаксацией* на самый нижний колебательный подуровень возбужденного состояния S_1 . Это означает, что независимо от того, в какое электронно-возбужденное со-

стояние была переведена молекула во время поглощения кванта света, в течение 10^{-13} – 10^{-12} с она перейдет на нижний колебательный подуровень возбужденного состояния S_1 . Время жизни молекул в S_1 -состоянии составляет 10^{-8} – 10^{-9} с. Именно на уровне S_1 решается дальнейшая судьба всех возбужденных молекул. От этого состояния берут начало все последующие, конкурирующие между собой фотофизические процессы, в конечном счете приводящие к дезактивации возбужденной молекулы.

Некоторые молекулы с большой вероятностью переходят из синглетного возбужденного состояния в триплетное, и этот переход сопровождается изменением спина электрона. Такой процесс является внутримолекулярным безызлучательным интеркомбинационным переходом и называется *интеркомбинационной конверсией*.

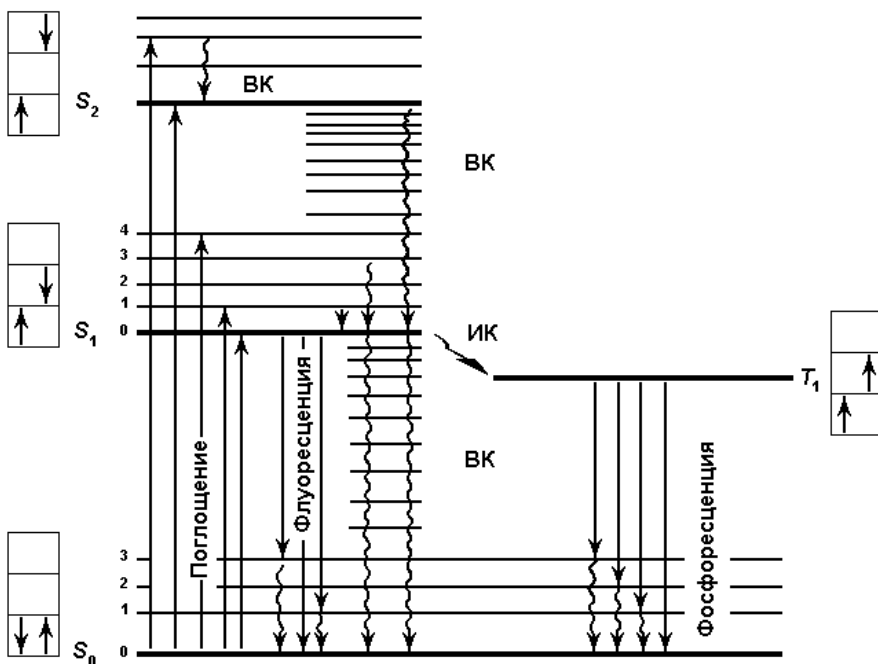


Рис. 3.1. Схема (диаграмма) Яблонского. Электронные переходы в биомолекулах: S_0 – основное (невозбужденное) состояние; S_1 , S_2 и T_1 – возбужденные синглетные и триплетные состояния соответственно; жирные горизонтальные линии – электронные уровни энергии, тонкие – 0, 1, 2, 3, 4 – колебательные подуровни. Прямые стрелки между уровнями – излучательные переходы, волнистые – безызлучательные. ВК – внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК – интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина)

Одним из путей возвращения молекулы в основное состояние является излучательная дезактивация с испусканием фотона. Это явление, как указывалось выше, называется *флуоресценцией* (см. рис. 3.1 и 3.2).

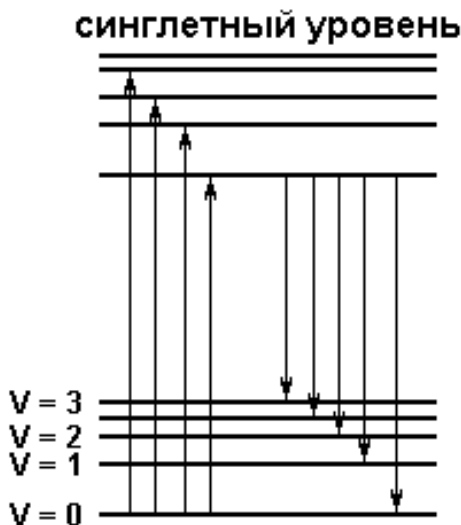


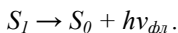
Рис. 3.2. Схема, иллюстрирующая явление флуоресценции

Именно при переходе с уровня S_1 на любой колебательно-вращательный подуровень основного состояния S_0 и происходит излучение кванта света. В общем случае *флуоресценцией называют разрешенный по спину излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности, а именно, между синглетными уровнями $S_1 \rightarrow S_0$* . Скорость испускания фотоэлектронов составляет около 10^{-8} с. Конечная длительность излучения составляет 10^{-8} – 10^{-9} с. Сравнительно небольшое время жизни синглетного возбужденного состояния объясняется тем, что переход с уровня S_1 на S_0 относится к разрешенным по спину и происходит с высокой вероятностью. Однако возбужденная молекула не всегда флуоресцирует. Эффективность флуоресценции описывается *квантовым выходом флуоресценции* – отношением количества излученных квантов к числу поглощенных. Иными словами, квантовый выход флуоресценции отражает вероятность дезактивации синглетного возбужденного состояния по излучательному пути.

Испускание фотона может происходить и при переходе молекулы из триплетного состояния в основное. Это явление называется фосфоресценцией. Время жизни молекулы в триплетном состоянии относительно велико, что связано с изменением спинового состояния электрона при испускании фотона. В противоположность флуоресценции характеристическое время фосфоресценции составляет значительную величину: от 10^{-6} до нескольких

секунд. Поскольку переход с T_1 на S_0 уровень относится к запрещенным по спине, он происходит с низкой вероятностью и, соответственно, с низкой скоростью (именно фосфоресценция является причиной свечения некоторых минералов в темноте после их предварительного облучения солнечным светом). Общий термин для любых излучательных переходов (флуоресценции и фосфоресценции) – люминесценция.

Многие биологически важные соединения, такие как белки, каротиноиды, хлорофилл, флавины и др., обладают свойством излучательной дезактивации синглетного электронновозбужденного состояния, т. е. флуоресценции. Такая флуоресценция называется собственной:



Например, собственная флуоресценция белков обусловлена ароматическими аминокислотами, входящими в их состав, причем из трех флуоресцирующих аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан) наибольший вклад в собственную флуоресценцию белка вносит триптофан. Флуоресценция белков обычно возбуждается в максимуме поглощения при 280 нм или больших длинах волн. Основная цель изучения собственной флуоресценции белков – получение информации об их конформационном состоянии. Возможность получения такой информации обусловлена тем, что как флуоресценция триптофана, так и флуоресценция тирозина существенно зависят от микроокружения хромофора в молекуле белка (т. е. растворителя, pH, присутствия малой молекулы тушителя или соседних групп в белке). Так, например, при уменьшении полярности растворителя флуоресценция триптофана смещается в область более коротких длин волн.

На рис. 3.3 приведены спектры поглощения ароматических аминокислот. Поглощение белков при 283 нм связано с тирозиновыми и триптофановыми остатками. При длинах волн > 295 нм поглощает главным образом триптофан.

Флуоресцентные спектры испускания ароматических аминокислот приведены на рис. 3.4. *Спектр флуоресценции* – это зависимость интенсивности флуоресценции образца от длины волны:

$$I_{fl} = f(\lambda),$$

где I_{fl} – интенсивность света флуоресценции в относительных единицах, измеренная при длине волны λ .

Из рис. 3.4 видно, что спектры флуоресценции белков в большей степени, чем их спектры поглощения, являются отражением структурной организации белковых глобул.

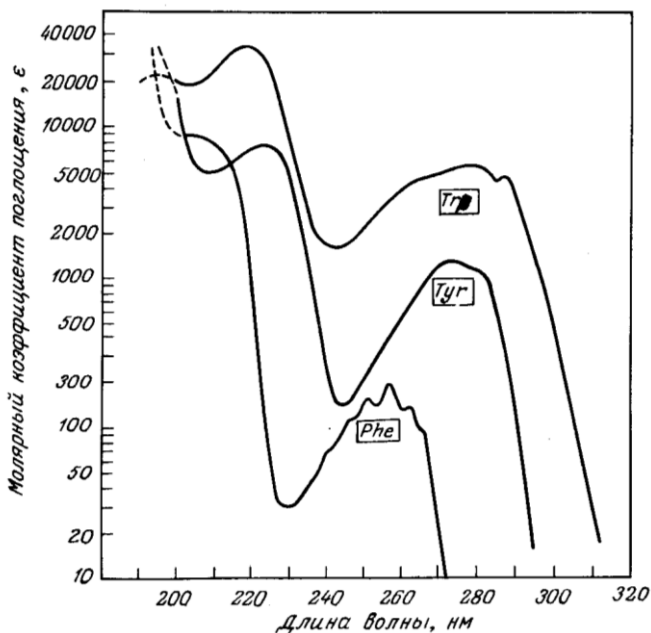


Рис. 3.3. Спектры поглощения ароматических аминокислот

При измерении интенсивности флуоресценции существенным является подбор концентрации исследуемого вещества. Чтобы поглощение света, а следовательно, и флуоресценция происходили равномерно по всей толщине раствора, при измерении пользуются разбавленными растворами, оптическая плотность которых не превышает 0,1–0,2. Интенсивность флуоресценции возрастает с увеличением интенсивности возбуждающего света (I_0) и в разбавленных растворах пропорциональна концентрации вещества.

Поскольку энергия поглощенного кванта частично расходуется на тепловые колебания, испускание флуоресценции всегда происходит с нижнего колебательного подуровня возбужденного состояния S_1 . Из приведенной на рис. 3.2 схемы видно, что потеря энергии поглощенного кванта происходит дважды. По этой причине спектр флуоресценции относительно спектра поглощения сдвинут в более длинноволновую сторону (*закон Стокса*).

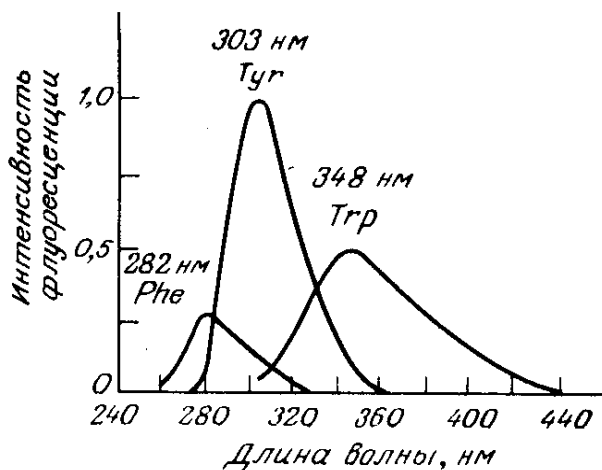


Рис. 3.4. Спектры флуоресценции ароматических аминокислот

Графически этот закон проиллюстрирован на рис. 3.5. Кроме того, благодаря процессам внутренней конверсии спектры флуоресценции не зависят от длины волны возбуждающего света (*правило Каши*).

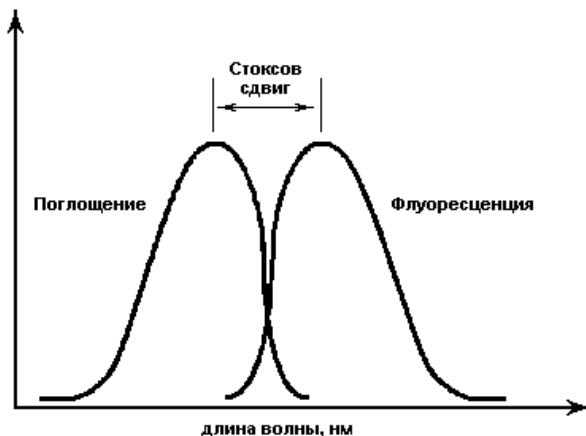


Рис. 3.5. Иллюстрация, поясняющая закон Стокса

Параметры флуоресценции (интенсивность, квантовый выход, положение максимума спектра, поляризация) очень чувствительны к структуре окружения флуоресцирующего хромофора (флуорофора). Макромолекулы глобулярных белков в водном растворе в нативной конформации представляют собой компактные плотные глобулы. Совершенно очевидно, что остатки триптофана в белке не унифицированы по локализации и свойствам окруже-

ния. Микроокружение каждого из них характеризуется своим набором физико-химических условий, таких как диэлектрическая постоянная, вязкость, наличие или отсутствие заряженных групп, различные специфические взаимодействия. Так, например, положение максимумов флуоресценции триптофанилов в составе отдельных белков имеют значения от 308 (азурин) до 342 нм (папаин). Изменение физико-химического состояния макромолекулы и, следовательно, микроокружения хромофора (изменение рН, тепловая денатурация и др.) приводит к значительным различиям параметров флуоресценции. Поэтому собственная флуоресценция веществ широко используется для изучения их химических превращений, межмолекулярных взаимодействий, конформационных перестроек, переноса энергии и др.

Измерение спектров флуоресценции проводят с помощью прибора, называемого спектрофлуориметром. Принцип работы спектрофлуориметра основан на выделении узких участков спектра как возбуждающего, так и испускаемого света и на выборе длин волн возбуждения и испускания с помощью монохроматоров при автоматизированном управлении работой прибора, регистрации и обработке результатов флуоресцентных измерений.

На рис. 3.6 представлена схема устройства спектрофлуориметра.

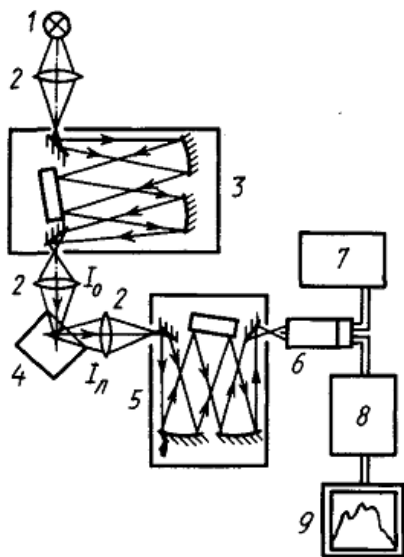


Рис. 3.6. Схема устройства спектрофлуориметра: 1 – источник света (лампа); 2 – линзы; 3 – монохроматор возбуждения; 4 – кювета с образцом; 5 – монохроматор испускания; 6 – ФЭУ; 7 – блок питания ФЭУ; 8 – усилитель; 9 – детектор.
 I_0 – возбуждающий свет; I_n – испускаемый свет

Для выделения соответствующих полос возбуждающего света используются монохроматоры. Пучок света высокой интенсивности проходит через

монохроматор возбуждения. Возбуждающий свет далее проходит через кювету с образцом. Чтобы исключить влияние падающего света, флуоресценцию наблюдают под прямым углом к падающему лучу. Испускаемый свет затем проходит через второй монохроматор для анализа длин волн и падает на светочувствительный детектор (фотоэлектронный умножитель – ФЭУ). В монохроматорах требуемый спектральный интервал выделяется при помощи щелей, линз и зеркал, а диспергирующими элементами служат призмы или дифракционные решетки. Большую роль при измерении спектра флуоресценции играют размеры щелей для возбуждающего света и света люминесценции. Обычно спектр представляется в виде зависимости выходного сигнала ФЭУ от длины волны.

Метод спектрофлуориметрии характеризуется исключительно высокой чувствительностью и специфичностью. С помощью данного метода можно изучать свойства флуоресцирующих веществ при концентрациях, гораздо ниже тех, которые требуются для измерения спектров поглощения.

Метод флуоресцентного зондирования

Анализ спектральных измерений собственной флуоресценции белков, как правило, затрудняется при изучении многокомпонентных систем. Например, присутствие органического растворителя приводит к двум противоположным эффектам, влияющим как на интенсивность флуоресценции, так и на величину $\lambda_{\text{макс}}$. Наличие в белках нескольких остатков триптофана, различающихся микроокружением и степенью экспонированности, затрудняет разделение спектральных вкладов каждого из них. Поэтому при решении ряда специфических задач, а также при исследовании нефлуоресцирующих или слабо флуоресцирующих веществ, широко используется *метод флуоресцентных зондов (ФЗ)*. Он основан на способности ряда флуоресцирующих соединений, специально синтезированных искусственных флуорофоров, изменять свои флуоресцентные параметры при взаимодействии с биосубстратами. Такие флуоресцентные красители объединяют одним общим названием флуоресцентные зонды.

Флуоресцентным зондом называется флуоресцирующая молекула, которая связывается с биологическими мембранами, белками, другими компонентами клетки нековалентными связями.

Применимость метода флуоресцентного зондирования ограничена несколькими требованиями к флуоресцирующему хромофору:

- флуорофор должен связываться со строго определенным участком биосубстрата (макромолекулы, биомембраны);
- флуоресценция флуорофора должна быть чувствительна к условиям окружения;
- флуорофор сам не должен оказывать влияния на свойства исследуемого объекта.

Все эти три критерия всегда следует учитывать при работе с флуоресцентными зондами.

Зонды, как правило, представляют собой небольшие молекулы, сравнимые по размерам с мембранными фосфолипидами. В качестве зондов обычно используют молекулы, параметры флуоресценции которых довольно резко меняются в зависимости от свойств среды. Поэтому, зная локализацию зонда в клетке, можно по параметрам его флуоресценции судить о физических свойствах непосредственного микроокружения молекулы зонда, т. е. о свойствах белков, биомембран, нуклеиновых кислот и других структур клетки.

В некоторых случаях компоненты клеток (например, белки, жирные кислоты и пр.) ковалентно связывают с флуоресцирующими молекулами («метят»). В этих случаях используется термин *флуоресцентные метки*.

Область поглощения зондов характеризуется положением максимума спектра поглощения и величиной молярной экстинкции в максимуме. Флуоресценция характеризуется следующими параметрами: *положением максимума спектра, полушириной спектра, интенсивностью в максимуме, квантовым выходом, временем жизни возбужденного состояния, поляризацией*.

Классификация зондов и их свойства

В настоящее время известно около 200 различных соединений, которые применяются в качестве флуоресцентных зондов. Для исследования биологических мембран синтезированы флуоресцирующие производные фосфолипидов и жирных кислот. Для изучения активных участков ряда ферментов и рецепторов – флуоресцентные производные АТФ, АДФ, АМФ.

Флуоресцентные зонды можно разделить на несколько групп:

1. Флуоресцентные зонды, несущие заряд – положительный (аурин О) или отрицательный 1-анилинонафталин-8-сульфонат (1,8-АНС), толудинонафталин сульфонат (ТНС). Эти зонды достаточно гидрофобны, но, благодаря заряду, они могут растворяться в воде.

2. Флуоресцентные зонды, не имеющие заряда, но обладающие значительным дипольным моментом. Эти зонды более гидрофобны.

3. Флуоресцентные зонды, не имеющие заряда и значительного дипольного момента (неполярные). К ним относятся пирен, перилен, дифенилгексотриен, ретинол.

На рис. 3.7 представлены структурные формулы некоторых наиболее часто используемых флуоресцентных меток и зондов.

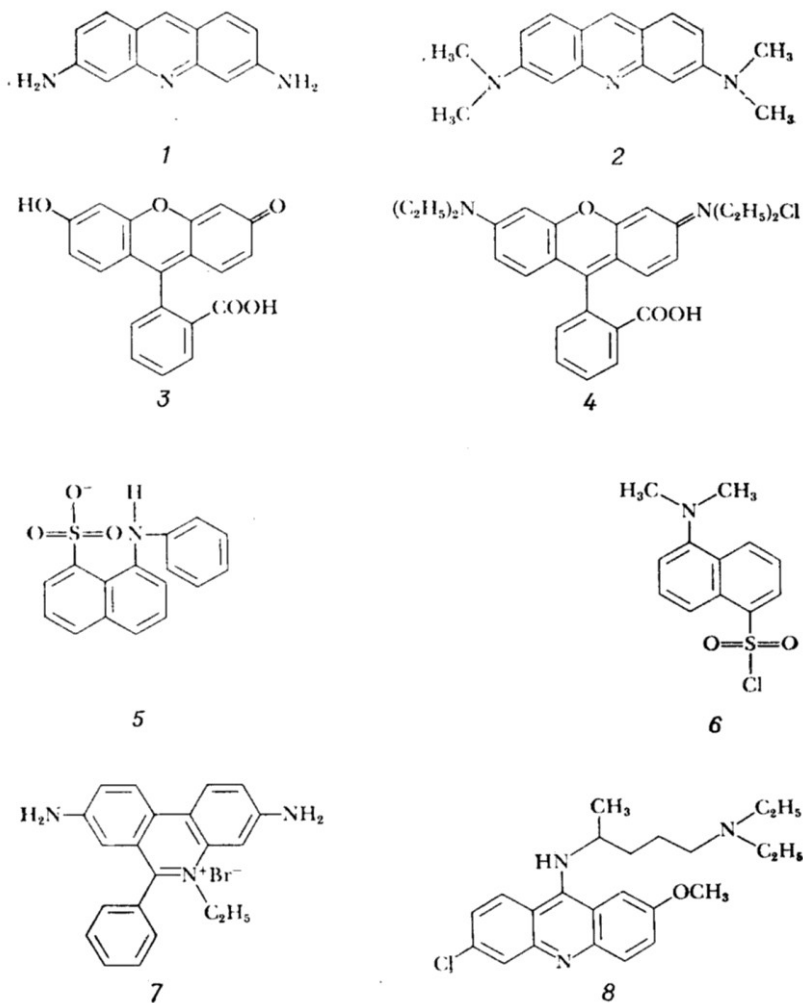


Рис. 3.7. Структура общеупотребимых флуоресцентных меток и зондов: 1 – профлавин; 2 – акридиновый оранжевый; 3 – флуоресцеин; 4 – родамин В; 5 – 1-нилинонафталин-8-сульфонат (1,8-АНС); 6 – дансилхлорид; 7 – этидийбромид; 8 – хинакринхлорид

Все зонды имеют гидрофобный радикал, но различаются по величине дипольного момента или наличием заряженных частиц, что определяет локализацию зонда в субстрате. Так, гидрофобные зонды внедряются в гидрофобную область биосубстрата, а амфифильные (т. е. имеющие и гидрофобную и полярную группы) локализуются на поверхности раздела биосуб-

страт-растворитель. Этим обстоятельством руководствуются при выборе зонда в зависимости от цели и объекта исследования.

Критерии, которыми руководствуются при выборе зонда

Одним из важнейших требований при выборе искусственного флуорофора является *значительное различие в параметрах флуоресценции свободного и связанного зонда* (положение максимума спектра флуоресценции, квантовый выход и др.). Этому требованию удовлетворяют, например, 1,8-АНС, ТНС, ретинол и др.

При выборе зонда необходимо убедиться в том, что *область его поглощения не перекрывается с областями поглощения компонентов биосубстрата*.

Сам зонд *не должен оказывать влияния на свойства самого биообъекта*. Эти три критерия всегда необходимо проверять. Кроме этого, выбор зонда желательно осуществлять таким образом, *чтобы соблюдались условия передачи энергии возбуждения в донорно-акцепторной паре*. Парам донор-акцептор могут быть: ароматические группы белка – зонд, зонд – гемопротеид, зонд 1 – зонд 2 и др. (более подробно о данном критерии речь пойдет ниже).

Для изучения флуоресцентных свойств белковых препаратов, в том числе биологических мембран, последним двум критериям удовлетворяет флуоресцентный зонд 1,8-АНС.

Использование флуоресцентных зондов для исследования биологических мембран и белков

Флуоресцентные зонды подбирают таким образом, чтобы они связывались с белками не в любом месте, а желательно в активных центрах, участках связывания субстратов, ингибиторов или кофакторов. Поэтому исследование с помощью ФЗ позволяет отвечать на следующие вопросы:

- а) сколько в белке участков, предназначенных для связывания малых молекул;
- б) какова энергия связывания;
- в) какова полярность участков связывания;
- г) располагаются ли вблизи участков связывания положительные или отрицательные группы;
- д) каковы размеры белковой молекулы;
- е) каково расположение белковых молекул в мембране;
- ж) какова толщина липидного бислоя мембраны и др.

Особенность исследования биологических мембран заключается в том, что зонды взаимодействуют не только с мембранными белками, но и с мембранными фосфолипидами. Сродство мембран к зондам зависит также от заряда поверхности мембраны.

Итак, метод флуоресцентной спектроскопии с применением искусственных флуорофоров позволяет оценивать конформационное состояние белков, физическое состояние мембранных липидов непосредственно в целой

ткани, процессы передачи энергии между молекулами. Метод флуоресцентных зондов дает возможность исследовать поверхностный заряд мембраны, состояние ее гидратной оболочки, трансмембранный потенциал и градиент рН, связывание с мембраной различных лигандов (лекарств, гормонов). С использованием метода флуоресцентного зондирования создаются условия для выявления относительных изменений микровязкости мембран в зависимости от температуры, получения информации о подвижности молекул, входящих в состав мембран.

Под подвижностью молекул подразумевается латеральная диффузия в пределах одного слоя, флип-флоп переходы – перемещение молекул из одного слоя в другой и др. Как известно, все биологические структуры по своей природе динамичны, поэтому при рассмотрении их функций необходимо учитывать подвижность компонентов, из которых эти структуры состоят. Так, например, по эффективности переноса энергии от зонда-донора, находящегося на одной стороне мембраны, к зонду-акцептору на другой ее стороне можно измерить толщину биологической мембраны. Кинетика изменения флуоресценции зонда по мере его входа в мембранные везикулы или выхода из них дает возможность зарегистрировать проницаемость мембран.

Флуоресцентные зонды применяют для определения степени связывания и локализации хромофора в мембране. Так, например, перемещение зонда из полярной области мембраны в неполярную ее часть сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции со сдвигом максимума спектра в коротковолновую область. Изучение интенсивности флуоресценции при введении флуоресцентных зондов в биомембраны и клетки позволяет выяснить изменение относительной микровязкости мембран в зависимости от температуры, действия многовалентных катионов, неполярных растворителей, концентрации ионов водорода и других факторов. В последнее десятилетие стали применять флуоресцентные зонды, чувствительные к изменению рН-среды (производные акридина), что позволило изучать изменение концентрации ионов водорода в разных участках клетки при протекании ряда физиологических процессов (дыхания, фотосинтеза и др.) и анализировать проникновение веществ через мембрану, метаболизм ряда веществ.

Связывание заряженных молекул зонда с мембраной зависит от плотности электрических зарядов в ней. При правильно подобранной концентрации интенсивность флуоресценции будет целиком зависеть от флуоресценции связанного с мембраной зонда. Это позволяет определять количество заряженных групп в мембране и величину трансмембранного потенциала. Определяя степень поляризации флуоресценции и используя флуорофоры с высоким квантовым выходом, можно изучать характеристики белок-липидных взаимодействий. Для этих целей применяют, например, дансил-хлорид, взаимодействующий с NH_2 -группами веществ.

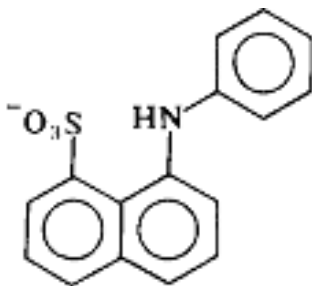
С помощью флуоресцентных зондов можно исследовать молекулярные механизмы возникновения и развития патологических процессов, действие

на организм биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Флуоресцентные зонды применяются также для диагностики и прогноза развития заболеваний, выявления факторов риска, что позволяет контролировать эффективность лечения заболеваний.

Таким образом, с точки зрения простоты, доступности и чувствительности метод флуоресцентных зондов не имеет себе равных.

Флуоресцентный зонд 1-анилинонафталин-8-сульфонат-анион (1,8-АНС)

«Универсальным» флуоресцентным зондом, реагирующим на самые разнообразные перестройки, происходящие в мембранах и других компонентах клетки, служит 1-анилинонафталин-8-сульфонат-анион (1,8-АНС):



Впервые 1,8-АНС был использован Д. Лоуренсом в 1952 г. для исследования связывания этого зонда с компонентами мембран. При этом выяснилось, что 1,8-АНС, который стал классическим примером зонда, способен распределяться между водной и мембранной фазами в определенной пропорции. Спектр поглощения 1,8-АНС (а, значит, спектр возбуждения флуоресценции) в водном растворе имеет максимум в области длин волн 350–360 нм.

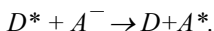
Ценным качеством 1,8-АНС является то, что в водном растворе он флуоресцирует очень слабо. Флуоресценция 1,8-АНС наблюдается практически только в связанном с мембраной (или макромолекулой белка) состоянии, т. е. он может считаться флуоресцентным зондом на наличие гидрофобной фазы. Но, поскольку 1,8-АНС имеет отрицательный заряд, его связывание с мембранами зависит от поверхностного заряда мембран: с ростом положительного заряда связывание растет, с ростом отрицательного – падает. Тем самым 1,8-АНС можно использовать также и в качестве зонда на наличие заряда на мембранах и на белковых макромолекулах. Это означает, что с помощью данного зонда можно исследовать, в том числе, и изменения поверхностного потенциала биологических мембран.

Изменение свойств среды, окружающей флуоресцирующие молекулы, отражается не только на спектрах, но и на квантовом выходе флуоресценции (квантовый выход – отношение числа излученных квантов к числу поглощенных). В некоторых случаях различия в квантовом выходе бывают весьма зна-

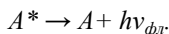
чительны. Так, например, квантовый выход (ϕ) флуоресценции 1,8-АНС в бутаноле равен 0,66, а в воде – 0,004. Будучи включенным в липидный слой мембран (например, липосомы из димиристоиллецитина), 1,8-АНС показывает довольно высокий квантовый выход флуоресценции ($\phi = 0,29$). Таким образом, можно видеть, что при переходе красителя из водной в мембранную фазу квантовый выход флуоресценции 1,8-АНС возрастает на ~ 2 порядка.

Сенсибилизированная флуоресценция

Одной из разновидностей испускания света является *сенсибилизированная флуоресценция*, которая наблюдается при переносе энергии между синглетными состояниями хромофоров. Такое явление наблюдается в случае присутствия в исследуемом образце двух хромофоров. Явление переноса энергии заключается в том, что молекула донора D^* переходит из возбужденного состояния в основное, одновременно передавая свою энергию молекуле акцептора А, которая при этом переходит в возбужденное состояние A^* :



При переносе энергии наблюдается тушение флуоресценции донора D^* и появляется испускание (флуоресценция) акцептора A^* или происходят фотохимические реакции A^* :



Хотя возбуждающий свет поглощается донором D, в возбужденном состоянии оказывается акцептор А. Процессы, в которых возбужденные молекулы образуются за счет переноса энергии, называются *сенсибилизированными*. Перенос энергии происходит эффективно, если энергия возбужденного состояния A^* меньше энергии D^* (рис. 3.8).

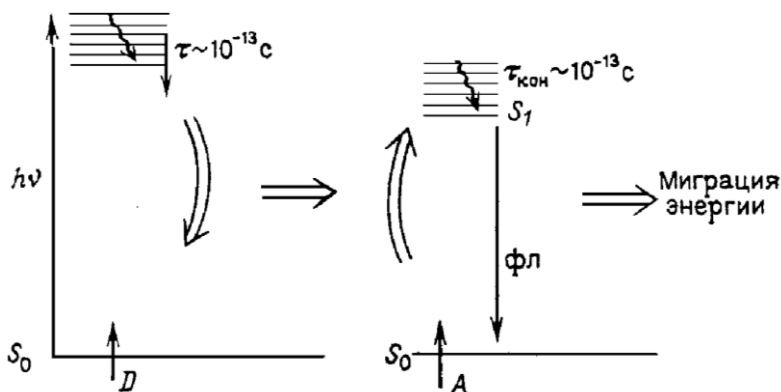


Рис. 3.8. Схема, иллюстрирующая явление резонансного донорно-акцепторного переноса энергии

Перенос энергии происходит за счет кулоновского взаимодействия между электронами в молекулах донора и акцептора. За время существования возбужденного состояния молекулы донора (D^*) генерируется переменное электромагнитное поле за счет осцилляции заряда электрона. Это поле взаимодействует с электроном в невозбужденной молекуле акцептора (A^-). Если частота переменного поля донора (D^*) совпадает с частотой перехода электрона в акцепторе (A^-) на возбужденный уровень, то происходит перенос энергии. При этом молекула акцептора переходит в возбужденное состояние (A^*). Перенос энергии носит безызлучательный характер, а вероятность переноса пропорциональна степени перекрытия спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора (рис. 3.9). Такой перенос энергии называется еще иначе *индуктивно-резонансным*.

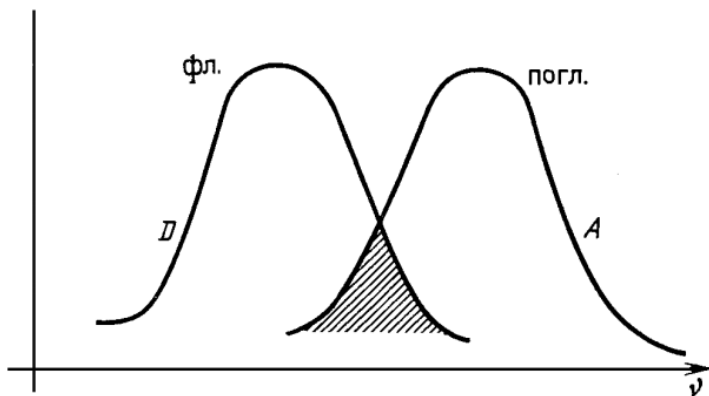


Рис. 3.9. Перекрытие спектра флуоресценции донора (D) и спектра поглощения акцептора (A)

Донорно-акцепторными парами могут быть: ароматические группы белка – зонд (в данной работе: триптофан – 1,8-АНС), зонд – гемопротеид, зонд 1 – зонд 2 и др.

Кроме степени перекрывания спектров флуоресценции (испускания) донора со спектром поглощения акцептора, скорость переноса энергии также зависит от взаимной ориентации диполей и от расстояния между донором и акцептором. Согласно принятой теории, эффективность переноса обратно пропорциональна шестой степени расстояния. Именно эта зависимость от расстояния привела к широкому применению эффекта переноса энергии для измерения расстояний между молекулами или различными участками макромолекулы. Индуктивно-резонансный перенос энергии может наблюдаться, если расстояние между донором и акцептором составляет величину порядка 20–50 Å. Этот диапазон расстояний сравним с диаметром большинства белков и толщиной биологических мембран. Поэтому явление переноса энергии может быть использовано для определения глубины залегания хромофоров

в мембранах или белках по отношению к поверхности раздела макромолекула/вода.

С помощью механизма индуктивно-резонансного переноса энергии, например, изучено структурное и физико-химическое состояние мембран эритроцитов у пациентов с хроническими заболеваниями печени. У этих больных выявлено уменьшение эффективности переноса энергии с мембранных белков (триптофанилов) на зонд пирен по сравнению с контрольной группой. Зонды 1,8-АНС и пирен используются для выявления нарушений в структуре мембран клеток при гипертонической болезни, экспериментальном гипертиреозе и миокардите.

Контрольные вопросы

1. Что такое флуоресценция?
2. Какие биологически важные молекулы обладают способностью к флуоресценции? Что общего в их химическом строении?
3. Назовите основные законы и правила, характерные для явления флуоресценции.
4. Какую информацию можно получить о структуре макромолекул и надмолекулярных структур при анализе параметров флуоресценции?
5. Что представляют собой флуоресцентные зонды? Назовите параметры, используемые для характеристики флуоресцентных зондов.
6. С какой целью применяют флуоресцентные зонды в молекулярной биологии, мембранологии и медицине?
7. Какие критерии необходимо учитывать при выборе зонда и почему?
8. Что такое сенсibilизированная флуоресценция, за счет чего она возникает?
9. Приведите примеры использования явления индуктивно-резонансного переноса энергии в научных исследованиях и практической медицине.

Литература

1. Рубин, А. Б. Биофизика: в 2-х томах / А. Б. Рубин. – М.: Наука, 2004.
2. Практикум по биофизике / В. Г. Артюхов [и др.]. – Воронеж, 2001. – 224 с.
3. Современные методы биофизических исследований / под ред. А. Б. Рубина. – М.: Высшая школа, 1988.
4. Конев, С. В. Фотобиология / С. В. Конев, И. Д. Волотовский. – Минск, 1979.
5. Черницкий, Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке / Е. А. Черницкий. – Минск: Наука и техника, 1972. – 258 с.
6. Артюхов, В. Г. Оптические методы анализа интактных и модифицированных биологических систем / В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева. – Воронеж, 1996.

7. Бенуэлл, К. Основы молекулярной спектроскопии / К. Бенуэлл. – М.: Мир, 1985.

8. Лакович, Д. Основы флуоресцентной спектроскопии / Д. Лакович. – М.: Мир, 1986.

9. Владимиров, Ю. А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980.

10. Фрайфелдер, Д. Физическая биохимия / Д. Фрайфелдер. – М.: Мир, 1980.

ХОД РАБОТЫ

Задание 1	Исследовать флуоресцентные свойства растворов ароматических аминокислот
------------------	--

1.1. Налить в кварцевую кювету 2 мл раствора триптофана (10^{-5} моль/л) и записать спектр флуоресценции. $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм.

1.2. Добавить в кювету каплю 1 н раствора NaOH, перемешать стеклянной палочкой и записать спектр флуоресценции. Сравнить полученные спектры по показателям $I_{\text{фл}}$ и положению λ_{max} .

1.3. К 2 мл раствора триптофана добавить 1 каплю 1 н раствора HCl, записать спектр флуоресценции. Сравнить положения λ максимумов всех спектров.

1.4. Повторить все измерения с соответствующими растворами фенилаланина и тирозина.

1.5. Сравнить положение максимумов в спектрах флуоресценции ароматических аминокислот. Сделать выводы.

Задание 2	Изучить спектры флуоресценции однокомпонентных белков
------------------	--

2.1. Налить в кювету 2 мл раствора сывороточного альбумина (10^{-3} моль/л) и записать спектр флуоресценции. $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм.

2.2. Записать спектры флуоресценции сывороточного альбумина при добавлении кислоты и щелочи. Сравнить спектры.

2.3. 5 мл сывороточного альбумина налить в пробирку, поместить в кипящую баню и прокипятить в течение 5 мин., остудить, записать спектр флуоресценции.

2.4. Сравнить полученные спектры. Сделать выводы.

Задание 3	Исследовать флуоресцентные свойства зонда 1,8-АНС в условиях различного микроокружения
------------------	---

3.1. Смешать в пробирке 2 мл раствора сывороточного альбумина с 0,05 мл зонда 1,8-АНС. Полученную смесь перелить в кварцевую кювету и записать спектр флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм.

3.2. Добавить в кювету 0,05 мл этанола. Записать спектр флуоресценции. Сравнить спектры и сделать выводы о том, как влияет степень гидрофобности микроокружения 1,8-АНС на его флуоресцентные свойства.

3.3. Повторить опыт (пп. 3.1–3.2) с суспензией эритроцитарных мембран при $\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм.

3.4. Повторить опыт (пп. 3.1–3.2) с суспензией эритроцитарных мембран при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм.

3.5. Суспензию эритроцитарных мембран (2 мл) проинкубировать в течение 10 мин. при комнатной температуре с 0,1 мл:

- 2,5 %-ного раствора глютарового альдегида;
- 0,5 %-ного раствора додецидисульфата натрия.

3.6. К полученным образцам добавить зонд 1,8-АНС (по 0,05 мл). Записать спектры флуоресценции при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм. Спектры флуоресценции полученных образцов сравнить. Сделать выводы.

Сделать выводы о влиянии физико-химического состояния макромолекул и надмолекулярных структур, микроокружения хромофора (триптофана и ФЗ) на параметры флуоресценции (собственной и сенсibilизированной) изучаемых объектов.

Оформление работы

К занятию:

1. Кратко законспектировать теоретические данные по лабораторной работе.

Во время занятия:

2. Описать этапы работы.

3. Оформить результаты проведения экспериментов.

4. Сделать выводы.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Техника выполнения лабораторных работ

Важнейшими условиями эффективной работы в лаборатории являются:

- 1) целесообразное устройство лаборатории, т. е. рациональное размещение рабочих мест и оборудования;
- 2) подбор соответствующих инструментов, посуды и необходимых приборов;
- 3) экономное использование материалов при постановке экспериментов.

Одним из основных требований при проведении экспериментов является соблюдение чистоты. Химическая посуда при работе должна быть прикрыта чистой бумагой или часовым стеклом для предотвращения попадания пыли или других загрязнителей. С целью предупреждения оседания аммонийных солей, присутствующих в воздухе, рекомендуют закрывать склянку сверху стаканчиками (без носика) так, чтобы их края опирались на склянку. Грязную химическую посуду следует мыть сразу после окончания работы.

При использовании в экспериментах приборов необходимо начинать работу с тщательного изучения их устройства и правил эксплуатации.

Каждый работающий в лаборатории должен иметь халат, предохраняющий от порчи и загрязнения собственную одежду.

Для работы с кровью доноров или препаратами из крови, а также с агрессивными веществами, способными действовать на кожу, необходимо использовать резиновые перчатки.

Экспериментатор должен знать основные свойства применяемых им реактивов, в т. ч. степень их токсичности и способность к образованию взрыво- и огнеопасных смесей с другими реактивами.

По своему назначению реактивы подразделяют на две основные группы: общеупотребительные и специальные. К общеупотребительным реактивам относят кислоты (соляная, азотная, серная), щелочи (раствор аммиака, едкие натр и калий), оксиды кальция и бария, некоторые неорганические соли, различные индикаторы. Специальные реактивы применяют для определенных работ. По чистоте реактивы делят на химически чистые (х.ч.), чистые для анализа (ч.д.а.), чистые (ч.). Кроме того, имеются реактивы кондиций: технический (техн.), очищенный (оч.), особой чистоты (ос.ч.), высшей очистки (в.оч.) и спектрально чистые (сп.ч.). Для реактивов каждой из этих категорий установлено определенное допустимое содержание примесей.

Растворы реактивов необходимо готовить в том количестве, которое нужно для работы. Перед взятием реактива из банки с ее горла удаляют пыль или другие загрязнения для предотвращения попадания их в пересыпаемое вещество. Реактивы из банки берут при помощи фарфоровой ложки или шпателя. Просыпавшийся на стол реактив нельзя высыпать обратно в ту банку, где он хранится. На всех сосудах с приготовленными реактивами

должны быть этикетки с обозначениями (надписями), что хранится, или надписи, сделанные восковым карандашом для стекла. Реактивы, изменяющиеся под действием света, хранят в желтых или темных склянках.

Особую осторожность следует соблюдать при обращении с токсичными, огнеопасными (например, диэтиловый эфир, этиловый или бутиловый спирты, бензол, петролейный эфир) и взрывоопасными (хлорная кислота и ее соли) веществами. С огнеопасными реактивами следует работать вдали от огня и работающих нагревательных приборов.

Для приготовления растворов, споласкивания посуды после мытья используют дистиллированную воду, почти не содержащую примесей неорганических и органических веществ, получаемую путем перегонки водопроводной воды. Однако дистиллированная вода всегда содержит незначительные следы посторонних веществ, попадающих в нее из воздуха в виде пыли или вследствие выщелачивания стекла посуды. Для проведения более точных экспериментов используют бидистиллированную воду. Качество полученной дистиллированной и бидистиллированной воды (в т. ч. находившейся в течение длительного времени в лаборатории) необходимо ежедневно контролировать, определяя значение рН. Для длительного хранения дистиллированной воды рекомендуют закрывать бутылки с водой стеклянными притертými пробками. Однако предпочтительнее использовать в опытах свежеперегнанную дистиллированную воду.

Используемую в лабораториях химическую посуду подразделяют по своему назначению на посуду общего назначения, специального назначения и мерную. К группе общего назначения относят пробирки, воронки простые и делительные, стаканы, плоскодонные колбы, кристаллизаторы, конические колбы, холодильники и др. Посуда специального назначения используется для одной определенной цели. К мерной посуде, применяемой для измерения объема жидкости, относятся мерные цилиндры и мензурки, пипетки, бюретки и мерные колбы.

Необходимо отметить, что при проведении реакций в пробирке реактивы не следует применять в слишком большом количестве (пробирка не должна быть заполнена до краев). Желательно, чтобы пробирка была заполнена на 1/4 или 1/8 своей емкости. Для введения в пробирку твердого вещества используют бумажный «совочек» – полоску бумаги шириной чуть меньше диаметра пробирки, сложенную вдвое по длине. Содержимое пробирок надо перемешивать либо при помощи стеклянной палочки, либо легким ударом указательного пальца правой руки по низу пробирки. Недопустимо закрывать пробирку пальцем и встряхивать ее.

Для переливания и фильтрации жидкостей используют воронки, которые устанавливают или в специальном штативе, или в кольце на обычном лабораторном штативе. Для наполнения пипеток желательно пользоваться грушей или специальной насадкой. Следует помнить, что объем жидкости, вытекающей из пипетки, зависит от способа вытекания, который должен

быть таким же, как и применяемый при калибровании пипеток (при стандартной температуре +20 °С). Поэтому нельзя выгонять остатки жидкости из пипетки выдуванием или нагреванием рукой расширенной части пипетки. При отборе жидкости пипетка всегда должна находиться в строго вертикальном положении. Хранят пипетки в особом штативе или стеклянном цилиндре, на дно которого кладут несколько слоев фильтровальной бумаги. Пипетки закрывают сверху маленькими пробирками или куском чистой фильтровальной бумаги.

Мерные колбы служат для разбавления растворов до определенного объема или для растворения какого-либо вещества в определенном объеме соответствующего растворителя. Если в мерной колбе готовят раствор, то сначала насыпают или наливают через воронку растворяемое вещество, а остатки его в воронке тщательно смывают небольшими порциями воды. Затем наполняют колбу до половины водой, перемешивают ее содержимое до полного растворения и доливают воду до метки. Раствор в мерной колбе перемешивают путем ее многократного переворачивания при закрытом пробкой горлышке.

Посуду, вымытую в теплой воде, обязательно два-три раза споласкивают дистиллированной водой для удаления солей, содержащихся в водопроводной воде. Стеклопосуда считается чистой, если на ее стенках не образуются отдельные капли и вода оставляет равномерную тончайшую пленку. Часто в лабораториях для мытья посуды применяют хромовую смесь, т. к. хромовокислые соли в кислом растворе являются сильными окислителями. Для приготовления хромовой смеси в концентрированную серную кислоту добавляют около 5 % (от массы серной кислоты) кристаллического двуххромовокислого калия и осторожно нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до его растворения. Признаком непригодности хромовой смеси после ее длительного употребления для мытья посуды является переход ее цвета из темно-оранжевого в темно-зеленый.

Для взвешивания различных веществ используют техно-химические и технические весы для точного взвешивания (точность от 1 до 10 мг), а также аналитические (точность разных их типов – от 0,1–0,2 мг до 10^{-6} – 10^{-9} мг). Весы всегда должны быть чистыми. Нельзя насыпать вещества непосредственно на чашку весов. Разновесы можно брать только пинцетом, нельзя оставлять их на чашке весов, а хранить их следует в специально отведенном месте. Запрещается переставлять весы с места на место.

Для приготовления растворов используют только чистые растворители; если растворителем служит вода – то только дистиллированная или бидистиллированная.

В случае приготовления разбавленных растворов можно использовать следующие формулы. Пусть a – количество раствора, m (%) – концентрация раствора, которую нужно разбавить до концентрации n (%). Получающееся при этом количество разбавленного раствора x вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot m}{n},$$

а объем воды V для разбавления раствора – по формуле

$$V = a \left(\frac{m}{n} - 1 \right).$$

При приготовлении точных растворов взвешивание проводят на часовом стекле или в бюксе. Отвешенное вещество высыпают в чисто вымытую мерную колбу через чистую сухую воронку небольшими порциями. Затем несколько раз небольшими порциями воды обмывают над воронкой бюкс или часовое стекло, в котором проводилось взвешивание. Воронку также несколько раз обмывают дистиллированной водой.

Для быстрого приготовления точных растворов различных веществ (кислот, щелочей и солей) удобно применять фиксаналы. Это заранее приготовленные и запаянные в стеклянные ампулы точно отвешенные количества реактива, необходимые для приготовления 1 л 0,1 н или 0,01 н раствора. Для приготовления точного раствора вначале теплой водой смывают надпись на ампуле и хорошо вытирают ее. В мерную колбу емкостью 1 л вставляют специальную воронку с вложенным в нее стеклянным бойком, острый конец которого должен быть обращен вверх. Когда боек будет правильно уложен в воронке, ампуле с фиксаналом дают свободно падать так, чтобы тонкое дно ампулы разбилось при ударе об острый конец бойка. После этого острой конечной палочкой пробивают боковое углубление ампулы и дают содержимому вытечь. Не изменяя положение ампулы, ее тщательно промывают водой. Затем раствор доливают дистиллированной водой до метки. Растворы (за исключением точных) после приготовления следует обязательно профильтровать.

Учебное издание

**Шейко Людмила Михайловна
Бокуть Сергей Борисович**

**ПРАКТИКУМ
ПО МЕДИЦИНСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКЕ**

**Раздел
«Биологическая физика»
Методы биофизических исследований»**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

*Редактор С. М. Курбыко
Корректор С. М. Курбыко
Компьютерная верстка С. М. Курбыко*

Подписано в печать 07.06.2011. Формат 60×90¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура Times. Ризография.
Усл. печ. л. 4. Уч.-изд. л. 2,83.
Тираж 99 экз. Заказ № 163.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования «Международный государственный
экологический университет имени А. Д. Сахарова»

Республика Беларусь, 220070, г. Минск, ул. Долгобродская, 23

E-mail: info@iseu.by
<http://www.iseu.by>