ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БИОХИМИИ

САВИЦКИЙ АЛЕКСАНДР ПАВЛОВИЧ
ЕВТУШЕНКО ЕВГЕНИЙ ГЕННАДИЕВИЧ
КУДРЯШОВА ЕЛЕНА ВАДИМОВНА
ПОЛЬШАКОВ ВЛАДИМИР ИВАНОВИЧ
ГОЛЫШЕВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

ХИМФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ. СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ НА VK.COM/TEACHINMSU.

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ, ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ, НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ VK.COM/TEACHINMSU.

БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТКУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
СОЛОВЬЕВУ АННУ АНДРЕЕВНУ

Оглавление

Лекция 1 6
Формулировка проблемы 6
Методы биологии 7
Молекулярный имиджинг 7
Разработка мишеней для лекарств 8
Секвенирование 9
Микрогетерогенность в опухолях 10
Поиски ингибитора мишени 11
Комбинированный метод квантовой динамики 12
Спектральные методы 12
Методы изучения на уровне клеток 13
Widefield и конфокальная микроскопии 13
Двухфотонная микроскопия 15
Наноскопия 15
Трансляционная медицина 18
Микробиота 19
Лекция 2 20
Закономерности рассеяния света малыми частицами 20
Статическое светорассеяние 23
Метод динамического светорассеяния 27
Интерпретация автокорреляционной функции 31
Метод анализа траектории наночастиц 35
Лекция 3 40
О спектральных методах 40
Абсорбционная спектроскопия 42
Анализ белков 44
Дифференциальная абсорбционная спектроскопия 44
Метод кругового дихроизма 45
Изучение вторичной структуры белков 52
Исследование вторичной и третичной структуры белков с помощью КД спектроскопии 55
Лекция 4 57
Исследование вторичной и третичной структуры белка 57
Денатурация 61

Активность фермент-ПЭ комплексов в водно-спиртовых системах 61
КД в ближней УФ области 62
Денатурация фермента при сверхвысоком давлении 64
Применение КД для определения структурных изменений в белках при модификации 65
Влияние связывания белков с лигандами на денатурацию.....65
Амилоидозы 68
Применение мицеллярного подхода при ренатурации белков 71
Инфракрасная спектроскопия.....73
ИК-область.....74
Виды ИК-спектроскопии.....75
Виды колебаний.....77
Единицы измерения.....79
Факторы, влияющие на частоты колебаний функциональных групп 80
Лекция 5 83
Применение ИК-спектроскопии 83
Прикладные аспекты ИК спектроскопии 84
Получаемая информация.....84
Определение концентрации белка 87
Анализ вторичной структуры 88
Изучение состояния фосфолипидов 97
Контроль стабильности липосом методом ИК спектроскопии.....99
Применение ИК спектроскопии для изучения фазовых переходов в биомембранах. 99
Взаимодействие липидов биомембран с лекарственными средствами 100
Лекция 6 104
Основные понятия метода Ядерного Магнитного Резонанса 104
История ядерного магнитного резонанса 106
Основы ЯМР 106
Свойства некоторых биологически важных ядер.....107
Важнейшие области применения методом ЯМР в биологии и медицине 108
Особенности спектров ЯМР белков.....109
Двумерная спектроскопия ЯМР.....111
Гомоядерные (1H-1H) 2D методы ЯМР.....112
Метод последовательного отнесения сигналов боковой цепи 113
Метод последовательного отнесения сигналов с использованием 3D спектроскопии ЯМР .115

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Методы молекулярной динамики для минимизации потенциальной энергии 118
Метод симулированного отжига 118
Подведение итогов метода ЯМР 120
Контроль качества рассчитанных структур ЯМР 120
Практические аспекты определения структуры белка методом ЯМР 121
Лекция 7 122
Получение объектов исследования для ЯМР 122
Исследование нуклеиновых кислот методом ЯМР 123
ЯМР в изучении динамических свойств биомолекул 127
ЯМР в изучении внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий 132
Ограничения, характерные для методов ЯМР-скрининга 132
Методы ЯМР скрининга, основанные на наблюдении сигналов лиганда 132
Методы изотопного мечения биомолекул 133
Методы ускорения экспериментов ЯМР 133
Лекция 8 134
Основы электронной микроскопии. Просвечивающая электронная микроскопия 134
Сравнение светового и электронного микроскопов 135
Взаимодействие электрона и материи 136
Тяжелые элементы 136
Деструктивное влияние электронов 137
Дополнительные инструменты, использующиеся в электронной микроскопии 137
Подготовка образцов 137
Как исследовать крупные объекты? 138
Изучение небиологических образцов. Дифракция электронов на кристаллических структурах 139
Сканирующая электронная микроскопия 139
Подготовка образцов 140
Лекция 9 142
Сканирующая зондовая микроскопия. Основы метода 142
Типы взаимодействий и методы 142
Пьезотрубка 144
Режимы работы микроскопии 144
Атомное разрешение СТМ 145
Искажающие факторы СЗМ 146

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Артефакты....147
Атомное разрешение СТМ....149
Туннельная спектроскопия....149
Лекция 10....151
Применение контактных методик ССМ....151
Силовая спектроскопия....151
Динамические режимы ССМ....152
Современные подходы к комплексному изучению поверхностей....155
Двухпроходные методики на примере магнитной силовой микроскопии....155
Практические аспекты ССМ....156
Силовая спектроскопия единичных молекул....157
Силовая спектроскопия единичных межмолекулярных взаимодействий....157
Методы СЗМ-литографии....158
Лекция 11....159
Современные особенности системной биологии....159
Развитие микроскопии....159
Устройство микроскопа....160
Функция распределения точечного источника света....161
Конфокальная микроскопия....161
Способы получения изображения....162
Двухфотонная спектроскопия....162
Флуоресцентная детекция одиночных молекул....163
Время жизни возбужденных состояний....165
Лекция 12....167
Субдифракционная микроскопия....167
Метод PALM – photoactivated localization microscopy....168
Метод STORM....168
Метод STED – stimulated emission-depletion....169
Системная биология....171
Клеточный и молекулярный in vivo имиджинг....173

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 1

Формулировка проблемы

Исследования в биологии, биохимии, биотехнологиях и биомедицины требуют высокотехнологичных методов. Скорость биохимических процессов не превышает миллисекунд. Стало быть, экстремальная задача выглядит очень сложно: мы должны наблюдать за биохимическими процессами с разрешением в миллисекунды - фактически, идеальный метод должен позволять это сделать. Только тогда мы сможем наблюдать и расшифровывать процессы, идущие в живых организмах.

В качестве первого примера: клетка нейрона. В ней было три точки стимуляции; можно наблюдать изменение концентраций кальция, которые стартуют из этих точек. Концентрация кальция изменяется не по всей клетке одновременно, а происходят короткие по времени локальные колебания концентрации в разных участках. И это значит, что, если вы будете брать усредненное значение кальция за время секунды, вы пропустите вот эти интервалы изменений. Стало быть, вы можете попасть в любую точку локальных изменений при приготовлении препаратов, когда прекращаются биохимические процессы живого.

Первое требование - должен быть быстрый процесс, второе требование - следить нужно за живым нефиксированным препаратом, т.к. только в этом случае вы увидите вот эти пульсации, и это особенно актуально в современной нейробиологии. Нейробиология вообще это совершенно отдельная область и ей в курсе будет уделяться мало времени.

Но становится понятно, что базовые требования усложняются: нужно не только очень быстро следить, нужно ещё и следить за живым объектом, не нарушая его функций.

Вот еще один пример — это загадка семидесятых годов, когда впервые был открыт один очень опасный вирус, но было непонятно его поведение. Дело в том, что этот вирус вызывал мощнейший иммунный ответ, но не подвергался никакой нейтрализации. Конечно, речь идет о вирусе иммунодефицита человека. Он действительно вызывал мощнейший иммунную реакцию, специфические антитела вырабатывались в огромном количестве, но никакой нейтрализации не происходило, и инфекция развивалась. Поставили эксперимент со скоростной микроскопией и т-лимфоцитами, инфицированными вирусом и с зелеными флуоресцентными метками. Классическая догма предполагала, что вирус проникает в клетку, по умолчанию реплицируется, размножается, разрушает клетку, выходит из нее и ищет новую мишень, далее также проникает в следующую клетку и развивается. А здесь оказывалось, что вирус не выходит из клетки и не разрушает её, он ждёт, когда возникает контакт с другим т-лимфоцитом (иногда эту точку называют точкой синапса), и в этой точке контакта между клеточными мембранами и происходит передача вируса. Это означает, что вирус не выходит в объём, а антитела не имеют механизмов проникновения внутрь клетки, они уничтожают вирус только в межклеточном пространстве.

Такая визуализация тут же показала, что в случае борьбы с этим вирусом необходима совершенно другая стратегия. В настоящее время скоростная микроскопия широко известна и используема, и очень часто позволяет расшифровать механизмы распространения инфекции, эффективность проникновения разного рода вирусов внутрь клеток.

Методы биологии

Если же говорить в целом о биологических задачах, то можно назвать некоторые общеизвестные задачи и биологические методы. Например, молекулярная биология в основном работает с молекулами, такими как ДНК, РНК и белки, и методы соответственно это геномика и протеомика. Следующий уровень — это уровень клеток и тканей, где работает тканевая инженерия, все это собирается в целый организм, и все задачи обобщаются в задачах клинических исследований.

Известное выражение философа Гегеля гласит, что всё случайное закономерно, а все закономерное происходит случайно. Движущей силой химической реакции является тепловое движение молекул, которое в своей сути стохастично. А вот начиная с клеток появляется детерминированность. Дело в том, что реакция, в отличии от клетки, не обязана себя воспроизводить. А вот если мы говорим о клетках, то весь смысл их существования заключается в воспроизведении, и здесь появляется детерминированность, то есть стохастичность должна быть каким-то образом ограничена, и процессы должны стать закономерными.

Жизнь появляется на этой границе, на уровне клеток. Ну и соответственно если мы посмотрим с точки зрения динамики протеомики и геномики, то увидим сложную совокупность процессов. В организме существуют, триллионы клеток, в которых внутри есть хромосомы. Хромосома несут генетическую информацию (считается, что для млекопитающих это порядка 30 000 генов). Гены кодируют продукты, и, учитывая посттрансляционную модификацию, насчитывают порядка миллиона разных белковых структур, которые в итоге образуют, например, мышь. Для ответа на вопрос, как из простых молекулярных структур, закодированных в генах, собираются сложные живые организмы, появился молекулярный имиджинг. Существует достаточно много определений этого метода, одно из них: молекулярный имиджинг — это технология, которая позволяет прямо или опосредованно записывать пространственно-временное распределение молекул в клетках живых объектов, и это предназначено для того, чтобы отслеживать биохимические, диагностические или терапевтические процессы, которые так или иначе нужно отслеживать.

Молекулярный имиджинг

Молекулярный имиджинг, отслеживающий химические реакции в живом организме, направлен на то, чтобы увидеть самые разнообразные биологические процессы. Если говорить о геномике, то это будет регуляция экспрессии генов, ферментативные реакции или взаимодействие рецепторов на молекулярном уровне. Естественно, не рассматриваются такие физиологические процессы как кровоток, дыхание, движение.

Молекулярные образы — это этап развития современной биологической науки, и они имеют несколько аспектов. Прежде всего, если мы говорим о клинике, то каждое заболевание имеет молекулярную основу. Любое заболевание начинается с каких-то ошибочно идущих биохимических процессов, и поэтому молекулярные образы клеток позволяют разрабатывать методы ранней диагностики, когда процесс только начинается. Так что новейшие терапевтические методы направлены на специфические молекулярные механизмы, которые позволяют предотвратить развитие заболевания на ранних стадиях.

Пример: существует врожденное генетическое заболевание - фенилкетонурия - дефектом является всего лишь один ген фенилаланингидроксилазы. Дефектный фермент не превращает фенилаланин в тирозин, который играет большую роль в развитии и функционировании нервной системы, в целом в развитии организма. Это тяжелейшее заболевание приводит на конечных стадиях к появлению амилоидов в мозгу ребенка. Это приводит к тяжелым нарушениям развития, хотя сохраняется нормальная продолжительность жизни. На данный момент существует процедура проверки детей на фенилкетонурию. Дело в том, что на первой стадии заболевание протекают абсолютно бессимптомно, но при обнаружении в первые несколько дней жизни ребенка повышенной концентрации фенилаланина можно предотвратить проявление симптомов, назначив специальную диету с повышенным содержанием тирозина и пониженным - фенилаланина. Этот пример показывает, что знание молекулярных процессов и их патологий критически важно для предотвращения многих заболеваний, в частности генетических.

На данный момент молекулярному имиджингу в мире посвящено уже много монографий, работ по разработке этих методов анализа. Однако у нас это направление не столь популярно в исследованиях, и связано это прежде всего с высокими затратами как со стороны денег и оборудования, так и времени, потому что каждое такое полноценное исследование требует большого объема времени и очень высококвалифицированного персонала.

Разработка мишеней для лекарств

В лабораториях, проводящих исследования по разработке лекарств, от первых стадий разработки до последних доходят примерно 5 соединений из 10 000. В среднем такие испытания занимают 4 года, а последующие клинические испытания - 9 лет, в ходе которых к клиническому использованию допускается 1 соединения. Такая “труба исследования” одного единственного препарата стоит около миллиарда долларов, осуществляется большими научными коллективами и требует привлечения специалистов в очень разных областях.

Можно выделить стадии разработки лекарственного препарата. На первой стадии нужно выявить мишень - молекулярную особенность, которая приводит к развитию патологии. После чего нужно проверить, что эта мишень действительно так влияет и найти соединение, которое будут с ней взаимодействовать в нужном направлении -

модифицировать мишень, проводить с ней какую-то биохимическую реакцию или ингибировать реакцию. Далее исследование переходит на стадию доклинических испытаний, которые проводятся на клетках in vitro и на лабораторных животных in vivo. Именно на этой стадии приходится чаще всего возвращаться к уточнению мишени и взаимодействующих с ней соединений, и только после этого проводятся три стадии клинических испытаний.

Как идентифицировать мишень? Рассмотрим на конкретном примере. В центре биотехнологий есть программа по раку простаты, являющимся одним из наиболее распространенных типов рака у мужчин за 40 лет. К сожалению, для этого типа рака трудно распознавать маркеры, и непонятно, какие биохимические процессы определяют развитие патологического процесса. Как строится в этом случае поиск мишени? У здоровых волонтеров и пациентов с подтвержденным диагнозом рака простаты берутся биоптаты (образцы) и проводится анализ. Наиболее популярной на сегодняшний день является система, первая стадия которой основана на двумерном электрофорезе (электрофорез по О'Фарреллу). В итоге получают от нескольких сотен до нескольких тысяч пятен белков и анализируют соответственно здоровую когорту и когорту пациентов. Каждое пятно извлекается и анализируется методами масс-спектрометрии.

Секвенирование

На сегодняшний день возможно секвенировать белок на уровне нано- и пикограмм (то есть определять его аминокислотную последовательность) и таким образом идентифицировать молекулу, и можно узнать какой конкретно белок в данном случае является измененным химически.

Боковой амиотрофический склероз - тяжёлое аутоиммунное заболевание. В экспериментах, проведенных на специальных модельных мышах, были выявлены более 90 различий в белках, по сравнению с нормальными. Изменения в белках происходят либо на этапе изменений генов, либо на этапе посттрансляционной модификации. Соответственно, в данном варианте предусматривается переход от протеомики к геномике, но возможен и другой вариант исследований - "вылавливание" мутаций в генах и наблюдения за соответствующими уже белками.

На данный момент секвенирование белков активно развивается, и революционный взрыв в этих методах произошел с появлением наносеквенирования. На замену секвенированию по Сэнгеру и секвенированию по Максаму-Гилберту пришла нанопоровая технология. Специальная нанопора встраивается в искусственную мембрану, причем размер нанопор позволяет пропускать только свободное основание; более того, когда свободное основание проходит через нанопору, меняется ток, поскольку она блокирует движение ионов, и в зависимости от того какой ток и каково его расположение на шкале, можно определить, какое конкретно основание проходит. Берётся проводящий раствор 200 ммоль калий хлор (это чуть выше, чем осмотический раствор), добавляется одноцепочечная ДНК и экзонуклеаза, которая начинает щепить

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

цепь с конца. Нанопоровая технология имеют свои плюсы и минусы: она исключительно миниатюрна, достаточно дешева, но допускает большое количество ошибок при секвенировании, т.к. не всегда и не все молекулы одновременно проходят через нанопор; так что наносеквенирование — это эффективная методика для первичного скрининга больших объемов данных.

Более точный скоростной метод был предложен на основе технологии детекции одиночных молекул. На дне ячейки объёмом зептолитр, на дне которой закрепляется специальная конструкция, содержащая полимеразу, при добавлении одноцепочечной ДНК начинается синтез комплементарной последовательности ДНК из смеси субстратов (4х оснований, помеченных флуоресцентными метками, максимумы которых составляют 555, 568, 647 и 660нм). Химия этой метки такова, что вместе с основанием она находится в затушенном состоянии, но в момент, когда основание включается с последовательность, метка отщепляется и даёт флуоресцентную вспышку. Фотовспышка регистрируется детектором, и таким образом, в зависимости от цвета вспышки определяется вид присоединенного основания - происходит секвенирование ДНК с очень высокой скоростью и высокой надежностью. Такая технология позволяет считывать длинные фрагменты ДНК.

Микрогетерогенность в опухолях

Почему необходим такой внимательный анализ генетического состояния и протеома? Можно опять взять такой пример как опухоль. Онкологические заболевания — это один из сложнейших объектов для терапии. На сегодняшний день ясно, что одна из основных проблем терапии этого заболевания связана с тем, что в опухоли развивается микрогетерогенность, в ней развиваются субпопуляции, даже если это потомок одной-единственной опухолевой клетки. Поэтому, помимо классических генетических детерминант, произошедших в геномной ДНК и влияющих на развитие опухолевого процесса, по мере роста индивидуального роста опухолевой клетки, очень важную роль начинают играть негенетические детерминанты.

Что такое негенетические детерминанты? Это прежде всего эпигенетическая регуляция. Окружение влияет на клетку и происходит химическая модификация либо самой ДНК, либо белков, которые ассоциированы с этой ДНК. При таких модификациях начинает также нарушаться внутриклеточная иерархия дифференцировки различного рода белков, их экспрессия. Поскольку это чисто химические реакции, то важную роль играет стохастика этого процесса, а также окружение клетки и сама клетка, которая тоже может давать сигналы для саморегуляции.

В сущности, мы все произошли от одноклеточных организмов, которые стали собираться в определённые сложно организованные и контролируемые сообщества, где любой сбой в правильности прохождения клеточного цикла может привести к тому, что клетка “забывает”, что она часть сообщества и начинает развиваться и делиться самостоятельно. Опухолевая микрогетерогенность зачастую приводит к потере или модификации мишени для лекарств, разрабатываемых для терапии этих опухолей.

Теперь мы переходим к классическим химическим методам.

Поиски ингибитора мишени

Важную роль играет изучение структуры белков, их организации и функций. В мире организовано несколько консорциумов: например, англо-канадский консорциум Structural Genomics Consortium (SGC). Их основная задача выделять новые белки, кристаллизовать, изучать их структуру и пытаться понять функцию. Оказывается, что мы знаем и используем в качестве мишени очень маленький процент белков. Потенциально, технологии позволяют как бы на опережение брать орган подверженный тем или иным заболеваниям, и изучать основные его структурные белки с тем, чтобы, когда эти белки будут выявлены как потенциальные мишени, их структура уже была известна, и можно было бы переходит к поиску соединения для взаимодействия с мишенями.

Вот мы нашли белок и выявили его структуру, теперь нам нужно найти компонент для ингибирования или инактивации. Здесь начинается довольно сложная работа с привлечением самых разнообразных технологий, таких как фаговый дисплей или химические библиотеки, которые позволяют быстро анализировать порядка миллиона разных соединений и вариантов протекания химической реакции. Химическая библиотека, грубо говоря, представляет собой продукт химической реакции, но не один, а всё многообразие продуктов, которые там могут возникать. Весь этот набор продуктов анализируется одновременно, и это называют химической библиотекой.

Соединение (чаще всего его называют лигандом), которое должно связаться с молекулярной мишенью, как правило является небольшим пептидом, белком, антителами, или даже РНК. Для того, чтобы можно было отслеживать все эти реагенты, идут по двум путям: во-первых, лиганд может разрабатываться для дальнейшего объединения с каким-то терапевтическим агентом, во-вторых, лиганд может изначально иметь в себе все функции. Но, как правило, приходится добавлять какой-то терапевтический агент. Также лиганды метятся разнообразными радиоактивными и флуоресцентными метками, специально контрастируются для магнитно-резонансной томографии и для компьютерной томографии.

Покажем, как решается эта задача на примере тирозиновой киназы. Тирозиновая киназа играет важную роль в каскадах, участвующих в развитии и прогрессии раковой опухоли, причем киназ существует большое количество. Каждая киназа распознаёт триплет и проводит фосфорилирование тирозина. Если какая-то киназа пагубно работает в онкологическом процессе, можно ли создать ее ингибитор?

High throughput screening. Берётся триплет, специфичный для интересующей нас тирозиновой киназы (в растворе присутствуют АТФ, магний, марганец), происходит фосфорилирование тирозина, а к тирозину присоединяется витамин Н, или же биотин, маленькая молекула, которая не вызывает никаких стерических затруднений для связывания с антителами, но имеет своего партнера для связывания - авидин - с

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

которым она связана с константой 10-15 моль/л - это практически ковалентное связывание. Добавляется пара - антитела, меченые флуоресцентной меткой, и авидин, который связан с другой флуоресцентной меткой, и между ними возникает эффект индуктивно-резонансного переноса энергии. Поэтому, если произошло фосфорилирование, антитела свяжутся, и, после добавления авидина, связанного в данном случае с аллофикоцианином, будет наблюдаться вполне определенный характеристический сигнал, типичный для индуктивно-резонансного переноса энергии. Важно, что всё происходит в объёме гомогенного раствора, нет иммобилизации и отмывок. Реакция протекает достаточно быстро. Создана специальная аппаратура, например специальный 96 луночный планшет, удобный для работы человека. Также существуют планшеты на 384 лунки, на 9600 лунок, рассчитанные на работу автоматизированных аппаратов, которые могут обрабатывать в короткие сроки тысячи и десятки тысяч реакций. Таким образом, скрининг позволяет подобрать рабочее соединение из множества других. Полученное соединение используется как такое первое приближение, после чего соединение разными способами оптимизируют.

Комбинированный метод квантовой динамики

На сегодняшний день одним из наиболее интересных и наиболее эффективных подходов является использование методов компьютерного моделирования, комбинированного метода квантовой механики, молекулярной механики. Современные компьютеры для работы с живыми объектами слишком примитивны, и мы не можем описать химическую реакцию в квантовом приближении. Даже суперкомпьютеры, такие как Ломоносов, не могут полностью описать небольшой белок в квантовом приближении. Эту проблемы было предложено решить следующим способом: основной каркас и структуру молекулы описать классической механикой, и только активный центр белка, где происходит химическая реакция, описать квантовой механикой.

Этот комбинированный метод действительно позволяет решать сложные задачи поиска ингибиторов. Так, например, выполнены расчеты, позволяющие оптимизировать ингибиторы для определенного вида протеиназ. Основная проблема и сложность металлопротеиназ состоит в том, что они имеют очень близкую субстратную специфичность, и тем не менее работают в организме очень по-разному, что требует очень специфичных ингибиторов.

Спектральные методы

Целая группа разнообразных спектральных методов играет очень важную роль в изучении вот этого взаимодействия биомолекул. Прежде всего, это методы кругового дихроизма, в следующих лекциях мы ознакомимся с основными понятиями и закономерности, тем, как выглядят спектры кругового дихроизма аминокислот, полисахаридов. Метод кругового дихроизма позволяют определять и конформацию (не в плане 3D структуры, а соответствие нативной структуры), и конформационную стабильность. ИК спектроскопия позволяет прежде всего определять вторичную

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

структуру (это как вы помните, бета листы и альфа спирали). Можно наблюдать микроокружение различного рода групп, можно также применять при расщеплении определенных связей, если мы знаем точные характеристические параметры. В ИК спектроскопии можно следить за кинетикой ферментативных реакций, также возможно применять микроскопию - человеческий глаз не видит в ИК спектре, но с этим успешно справляется современная техника - специальные компьютеризированные микроскопы.

Еще два метода. Это так называется сканирующая зондовая микроскопия, которая позволяет изучать размеры адсорбированного вещества на подложке — это один из классических инструментов нанотехнологий, поскольку сканирующая зондовая микроскопия позволяет видеть нанообъекты. В определенном смысле его аналогом в растворе является динамическое светорассеяние, которое по рассеянию света позволяет определять такие параметры как скорость диффузии, и, косвенно, по коэффициенту диффузии, размеры образований, формирование тех или иных комплексов - вы можете определять взаимодействие веществ, изменение при этом конформации. Методы Dynamic Light scattering (динамическое светорассеяние) позволяет достаточно хорошо определять размеры, анализировать ферментативные реакции в растворах. Ну и конечно один из основных и очень мощных инструментов исследований — это методы ЯМР спектроскопии, которые позволяют определять структуру и конформацию белков, причем не в кристалле, а в растворе, хоть и высокой концентрации.

Определение происходит с точностью, сопоставимой с рентгеноструктурным анализом, только учитывая тепловое размывание молекул.

Время в последние годы стали развиваться методы изучения больших биомолекул, и на сегодняшний день, но они позволяют достаточно хорошо расшифровывать функциональные свойствах белков в растворе. Популярна идея кристаллизации ферментов вместе с их регуляторами или субстратами с тем, чтобы увидеть, как это влияет на конформацию.

Для этого ЯМР более эффективный метод, он позволяет значительно быстрее достигать результатов.

Методы изучения на уровне клеток

Widefield и конфокальная микроскопии

Наилучший способ изучать клетки — это микроскопия. Клетки и ее структурные элементы — это микрообъекты, требующие микроскопов с достаточно высоким качественным разрешением. Существует несколько видов микроскопия. Одни из самым популярных: обычная микроскопия, в англоязычной литературе называемая wightfield, а также конфокальная микроскопия. Для улучшения разрешение в конфокальной микроскопии используется “pinhole” — это действительно маленькое отверстие, которое в зависимости от типа оптики может быть 20-100 микрон.

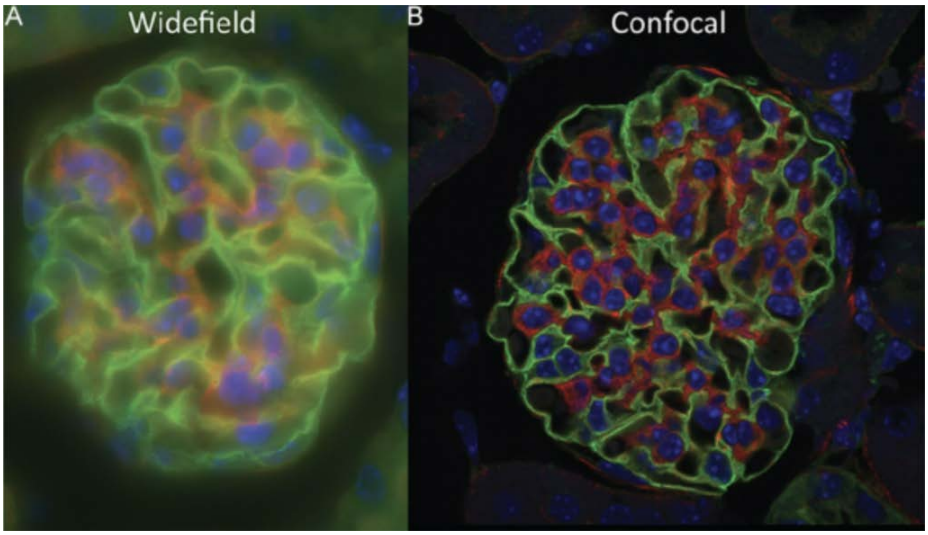


Рис. 1.1 Изображения, полученные путем widefield и конфокальной микроскопии.

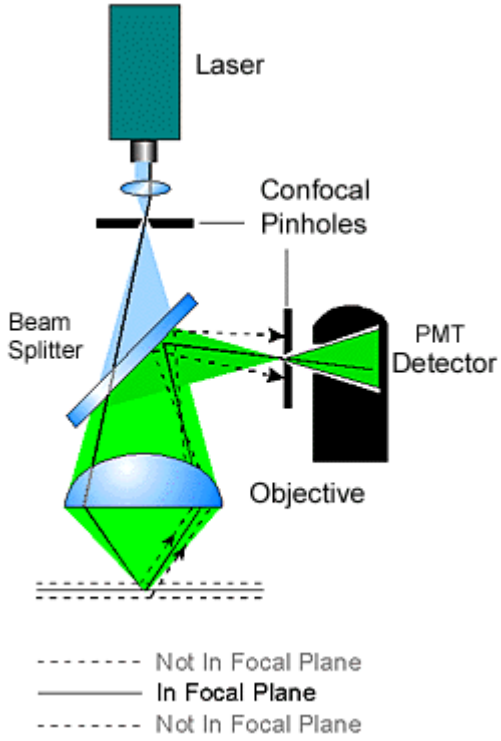


Рис. 1.2 Принцип работы конфокальной микроскопии.

Конфокальный микроскоп позволяет получить трехмерную структуру (за счет фокусировки на разных плоскостях). Так, например, конфокальная микроскопия значительно продвинула изучение опухолей.

Конгломерат опухолевых клеток - сфероиды, в которых клетки слипаются, формируя шарик размером вплоть до 200-500 микрон. Послойное снятие структуры - главное достижение конфокальной микроскопии - автоматически привело к появлению новой биологической модели, которая намного более адекватно отражает процессы,

происходящие внутри клетки. Когда опухоль растёт, она состоит не только из опухолевых клеток, но и из макрофагов. При смешивании культур макрофагов и опухолевых клеток получаются сложные структуры, которые получили название 3D моделей, т.к. они уже моделируют трехмерное окружение опухолевой клетки и позволяют более точно анализировать процессы в них протекающие.

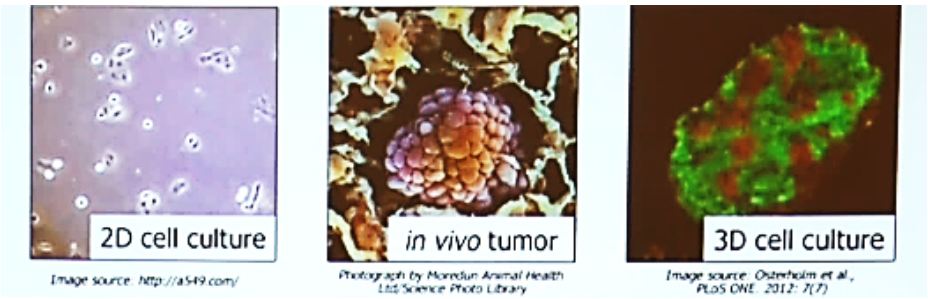


Рис. 1.3 Изображения различных моделей развивающейся опухоли.

Двухфотонная микроскопия

Двухфотонная микроскопия как явление впервые была предсказана и экспериментально показана еще в тридцатые годы Марией Гёпперт-Майер. Если мы используем крайне интенсивный источник света с длиной волны для возбуждения в два раза более длинной по сравнению с тем, которая необходима для возбуждения, то, когда достигается определенная плотность фотонов, молекула хромофора “глотает” одновременно два фотона и попадает на нужный энергетический уровень. Все это описывается так называемой нелинейной оптикой, т.к. имеется зависимость от мощности светового пучка. Этот метод начал бурно развиваться только с появлением лазеров, в которых легко достигается необходимая плотности фотонов.

Наноскопия

В настоящее время происходит переход в область наноскопии. В 2008 году за разработку метода была присуждена Нобелевская премия. Наноскопия (Nanoscopy, ground state depletion (GSD) microscopy) - метод оптической микроскопии, позволяющий достичь разрешения 10-30 нанометров при использовании видимой или ультрафиолетовой части спектра. Метод основан на явлении люминесценции и позволяет получать в том числе трехмерные изображения высокого разрешения живых биологических объектов. Как это происходит? В оптике есть критерий, связанный с интерференцией и ограничивающий размеры наблюдаемых объектов. Однако если у нас есть одиночная светящаяся точка, то свет от неё начинает распространяться по так называемой point spread function функции распределения. Флуоресценция двух находящихся рядом молекул перекрывается, и мы не можем их различить. Если “включить” только одну молекулу, записывать ее флуоресценцию и поступать так много раз с соседними молекулами, то можно получить крайне большое разрешение. Какими методами достигается включение ограниченного количества молекул будет рассказано в отдельной лекции.

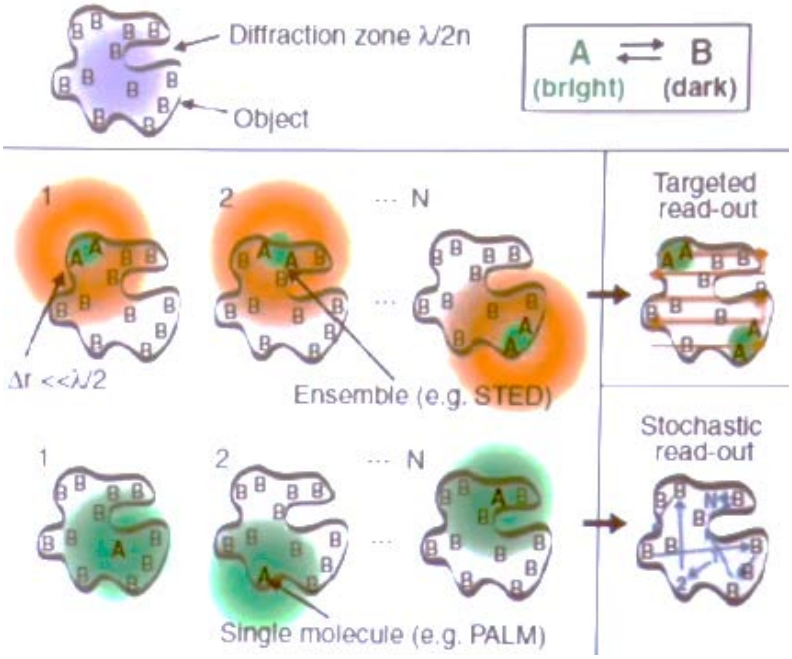


Рис. 1.4 Принцип работы наноскопии.

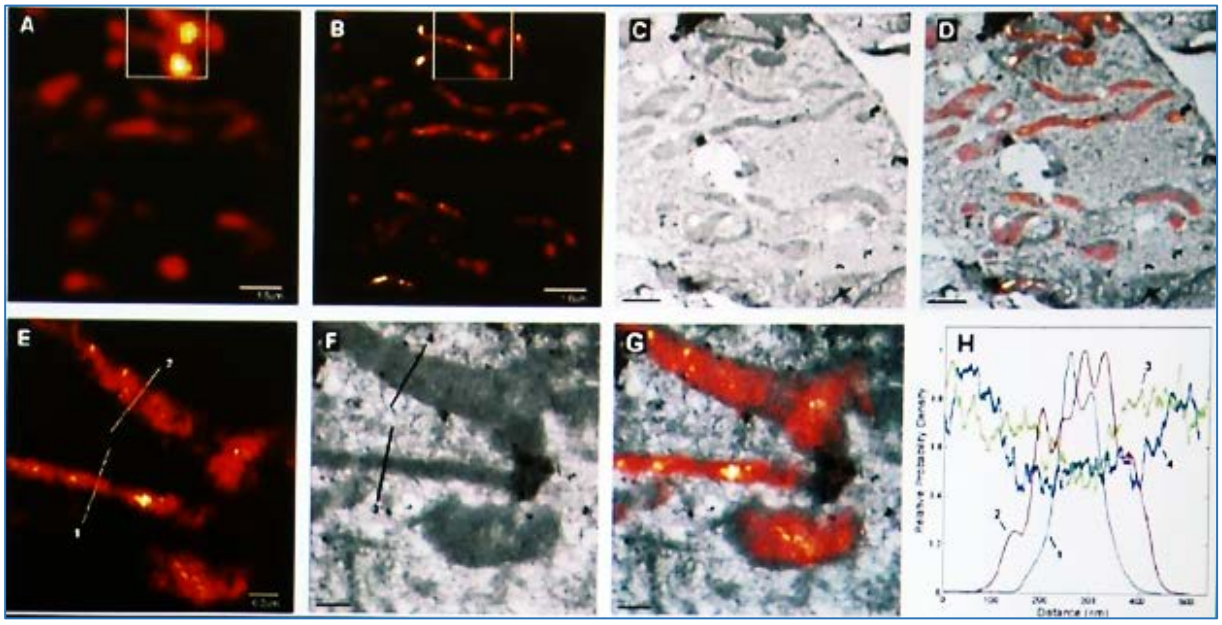


Рис. 1.5 Изображения фрагментов митохондрий, полученные с помощью флуоресцентной наноскопии и электронной микроскопии. Флуоресцентная наноскопия позволяет получить более структурированное изображение в живой клетке (фрагменты размером порядка десятков-сотен нанометров), в то время как электронная микроскопия предполагает работу только с фиксированными препаратами.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

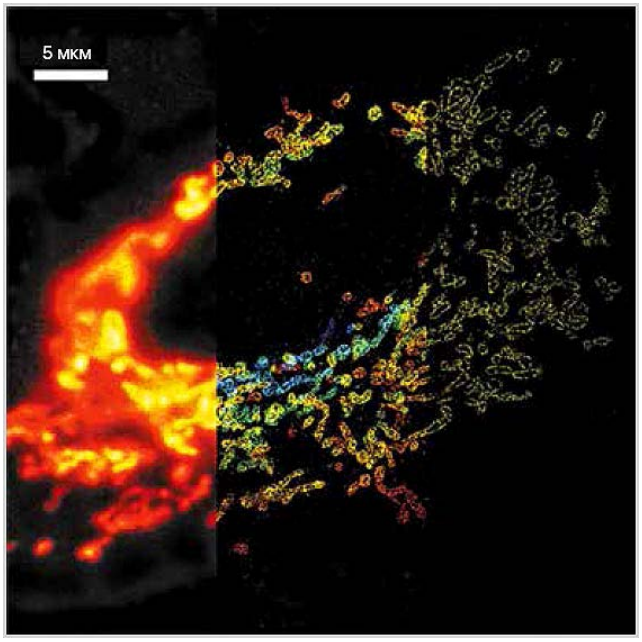


Рис. 1.6 Технология 3-D STORM, примененная к митохондриальной сети. Методы слева направо: widefield флуоресцентная микроскопия, наноскопические изображения - в центре реконструированное трехмерное изображение, справа — «срез внутри среза», изображение с тонкой плоскости

В наши дни излюбленным объектом исследований является мышь. За счет короткого репродуктивного цикло возможно довольно быстро наблюдать отдалённые последствия того или иного воздействия, в т.ч. передающегося по наследству. Для исследования на мышах выпускаются различные специализированные приборы, различные по размерам и “глубине” проникновения в животное. Приборы не являются универсальными и имеют свои достоинства и недостатки. Приборы, основанные на флуоресцентных технологиях, значительно превосходят все остальные только в одном параметре - они великолепно видят молекулярные события в широчайшем диапазоне времён, в отличие от всех остальных технологий, которые видят молекулярные события очень ограниченно.

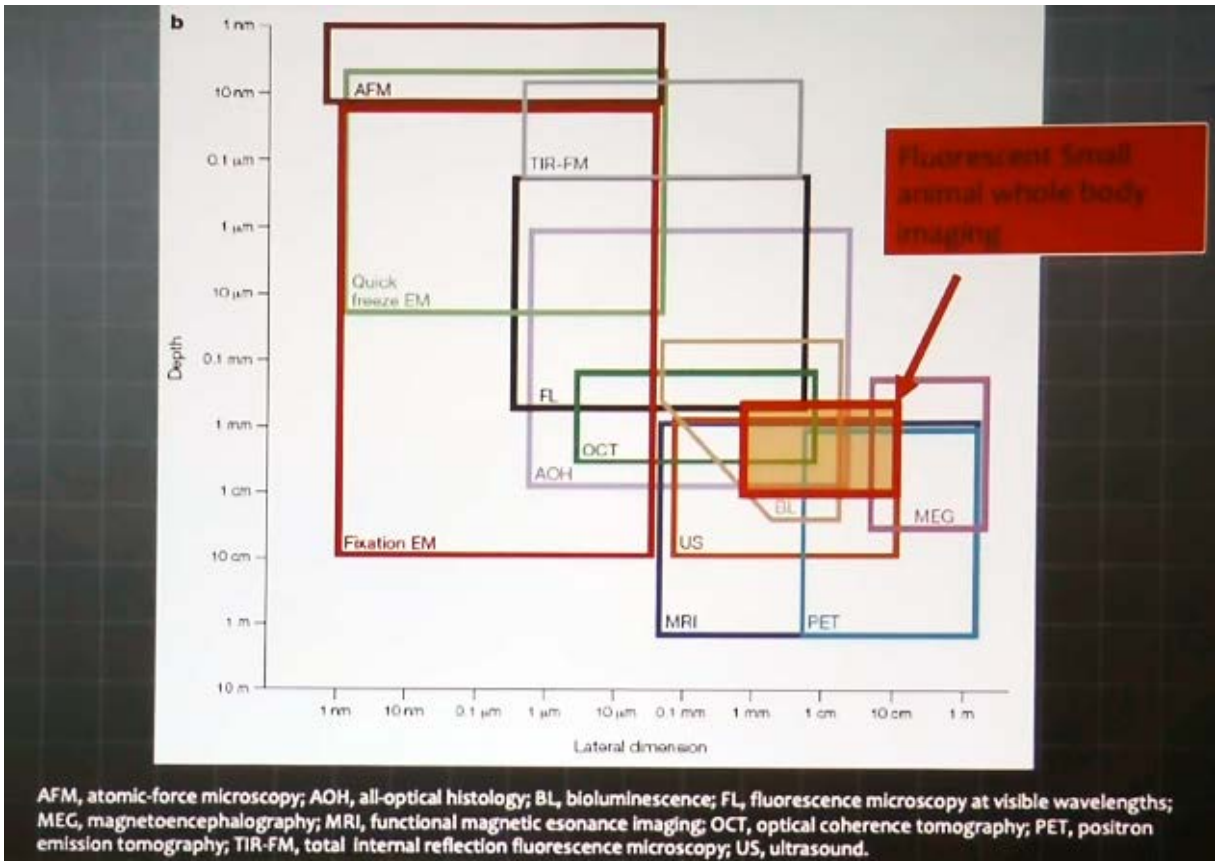


Рис. 1.7 Сравнение различных технологий исследования по глубине проникновения в животное и по размерам.

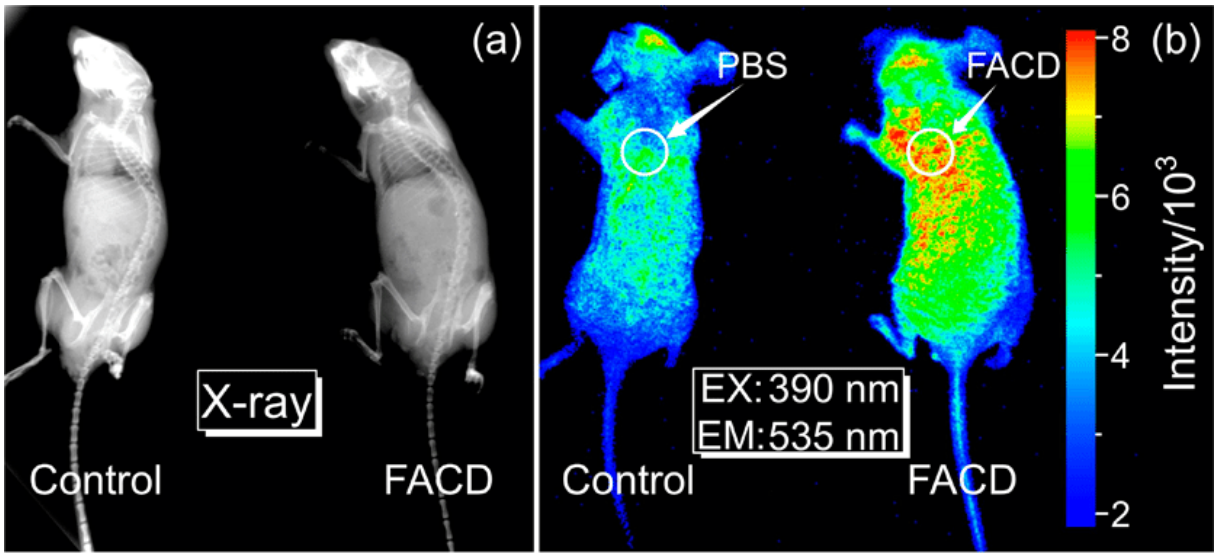


Рис. 1.8 Исследование мыши in vivo: мягкий рентген и флуоресцентный биоимиджинг.

Трансляционная медицина

Могут ли результаты исследований, полученные на лабораторных животных, транслироваться на человека? Это довольно сложный вопрос, решение которого требует хорошего знания геномов. Второй полностью расшифрованный геном был

геномом мыши. Хотя человек и мышь относятся к одной и той же группе млекопитающих, тем не менее, они достаточно различны. В настоящее время создается довольно много генно-модифицированных животных, в том числе мышей, которым пересаживаются человеческие органы или ткани с тем, чтобы более точно проводить испытания, и это довольно дорогой и сложный процесс, но тем не менее необходимый для получения более релевантных данных.

Основная проблема трансляционной медицины — это, на самом деле, системная биология. Классически рассмотрение человека включает в себя геном, транскриптом, протеом, и считается, что функция появится сама. При современном рассмотрении предполагается, что все сводится к главному - метаболизму (метаболом). Многие эксперты в сфере генной инженерии сходятся во мнении, что, несмотря на расшифровку генома человека, на данный момент развитие заболеваний не может быть предсказано на основании одних только генетических данных, без рассмотрения метаболома. На метаболизм влияет образ жизни и многие окружающие факторы за счет эпигенетических изменений, к которым относятся метилирование ДНК, ацетилирование гистонов. Эпигенетические изменения в первую очередь влияют на метаболизм углеводов, белков и жиров, что напрямую связано с работой митохондрий. Все это приводит к индивидуальным изменениям тех мишеней, которые могут быть задействовано при поиске лекарства, что создает трудности уже на этапе клинических испытаний.

Микробиота

Симбионты человека играют важную роль в его жизни: синтезируют вещества, не вырабатываемые организмом человека, участвуют в переработке пищи. Уже выявлены заболевания, которые четко зависят от микробиома, и которые подвергаются попыткам течения при помощи изменения структуры микробиома. Фенотип человека во многом определяется эпигенетикой, на которую влияют внешние факторы, и не в последнюю очередь - микробиота.

Лекция 2

Эта лекция будет посвящена использованию методов светорассеяния для исследования растворов полимеров и коллоидных растворов наночастиц. Необходимо сказать, что свет может взаимодействовать с малыми и не только малыми частицами в целом ряде аспектов: мы будем наблюдать различных физические явления, которые имеет свои математические модели и математический аппаратом. Это обуславливает многообразие методов исследования всевозможных коллоидных растворов с использованием рассеяния света.
Необходимо рассмотреть два аспекта теории: первый связан с тем, как частицы разных размеров рассеивает свет в разные стороны, как выглядит угловая зависимость интенсивности рассеяния света у разных частиц.
А также необходимо будет рассмотреть, как абсолютная интенсивность рассеяния света зависит от размера частиц или, для полимеров, от молекулярной массы. Эти знания пригодятся при рассмотрении методов статического светорассеяния, лазерной дифракции.
Частицы в коллоидных растворах не является статичными - их перемещение описывается броуновским движением, и характеристики броуновского движения можно использовать для получения информации о размерах частиц в коллоидных растворах.
Индикатриссой рассеяния называют кривую, описывающую зависимость интенсивность рассеянного света от угла рассеяния.

Закономерности рассеяния света малыми частицами

Договоримся, что в данном случае рассматривается только упругое рассеяние света, и используются монохроматические когерентные источники - то есть, проще говоря - лазер, плоско поляризованный.
Световая волна представляет собой распространяющееся в пространстве колебание вектора напряженности электрического поля E и перпендикулярное ему колебание вектора напряженности электромагнитного поля H. Сразу уточним, что в этой лекции практически не будет рассматриваться магнитное составляющее.
Допустим, что есть некоторый объем раствора, а в нём маленькая частица. Если по сравнению с длиной волны падающего излучения эта частица мала, и ее показатель преломления отличается от показателя преломления раствора, то такая частица является оптической неоднородностью, и электрическое поле падающей световой волны будет возбуждать в ней диполь. А поскольку напряженность электрического поля меняется, то этот диполь будет также осциллирующим на частоте падающего излучения.

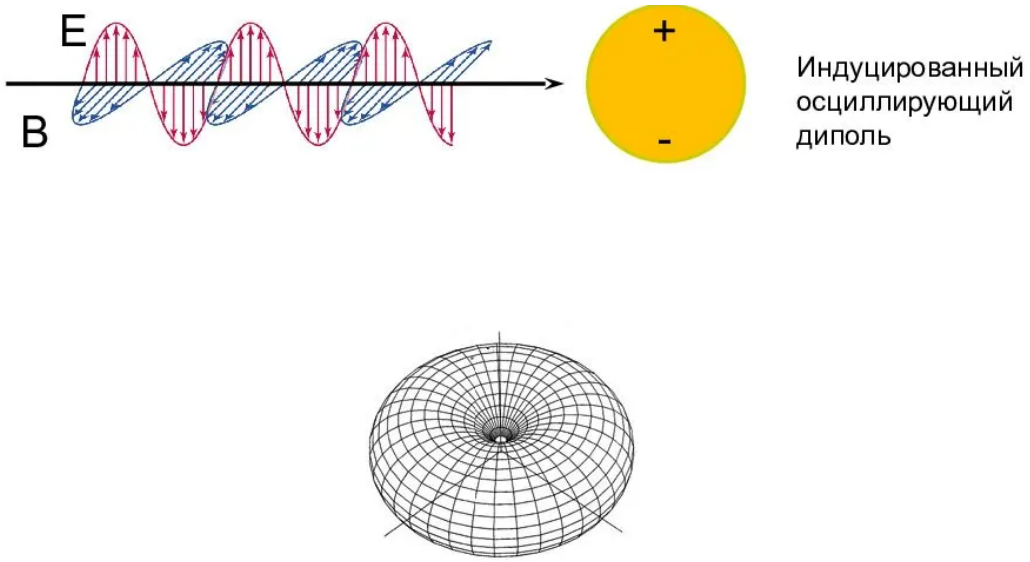


Рис. 2.1 Схема электромагнитной волны и модель светорассеяния малой частицы

И первый случай, который мы рассмотрим — это так называемое релеевское рассеяние. Размера частицы должен быть сильно меньше длины волны, условно меньше, чем λ/20; в этом случае всю частицу можно представить как единую точку, и все свойства осциллирующего диполя будут справедливы для таких частиц. Поэтому в перпендикулярной плоскости поляризации рассеивает частица во все стороны одинаково, угловая зависимость в этом случае отсутствует. Для частицы с большими размерами необходимо складывать диполи с учетом задержки по фазе, которая приходит от разных частей частицы. Для более крупных частиц индикатриса - угловая зависимость - будет вытягиваться вперед, то есть чем крупнее частица, тем больше света она рассеивает вперед.

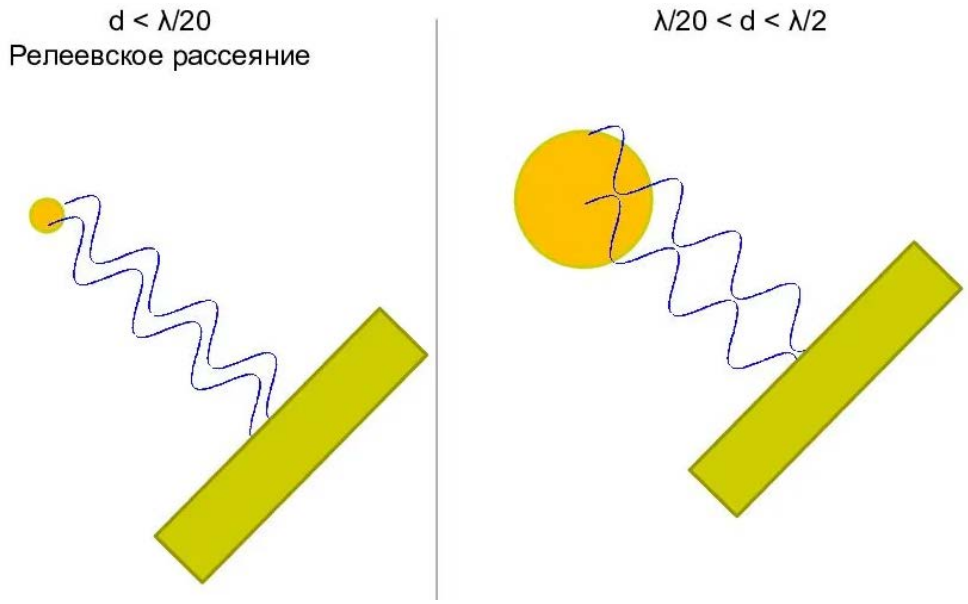


Рис. 2.2 Зависимость светорассеяния от размера частицы.

И первый случай, который мы рассмотрим — это так называемое релеевское рассеяние. Размер частицы должен быть сильно меньше длины волны, условно меньше, чем λ/20; в этом случае всю частицу можно представить как единую точку, и все свойства осциллирующего диполя будут справедливы для таких частиц. Поэтому в перпендикулярной плоскости поляризации рассеивает частица во все стороны одинаково, угловая зависимость в этом случае отсутствует. Для частицы с большими размерами необходимо складывать диполи с учетом задержки по фазе, которая приходит от разных частей частицы. Для более крупных частиц индикатриса - угловая зависимость - будет вытягиваться вперед, то есть чем крупнее частица, тем больше света она рассеивает вперед.

У частицы размером больше λ/2 появляются максимумы и минимумы индикатриссы рассеивания.

Рассмотрим частицу размером ровно λ/2. Между крайними точками частицы будет разность хода волны λ/2. Это значит, что эти лучи, при фиксации детектором на 90 градусов, будут испытывать полную деструктивную интерференцию и друг друга погасят.

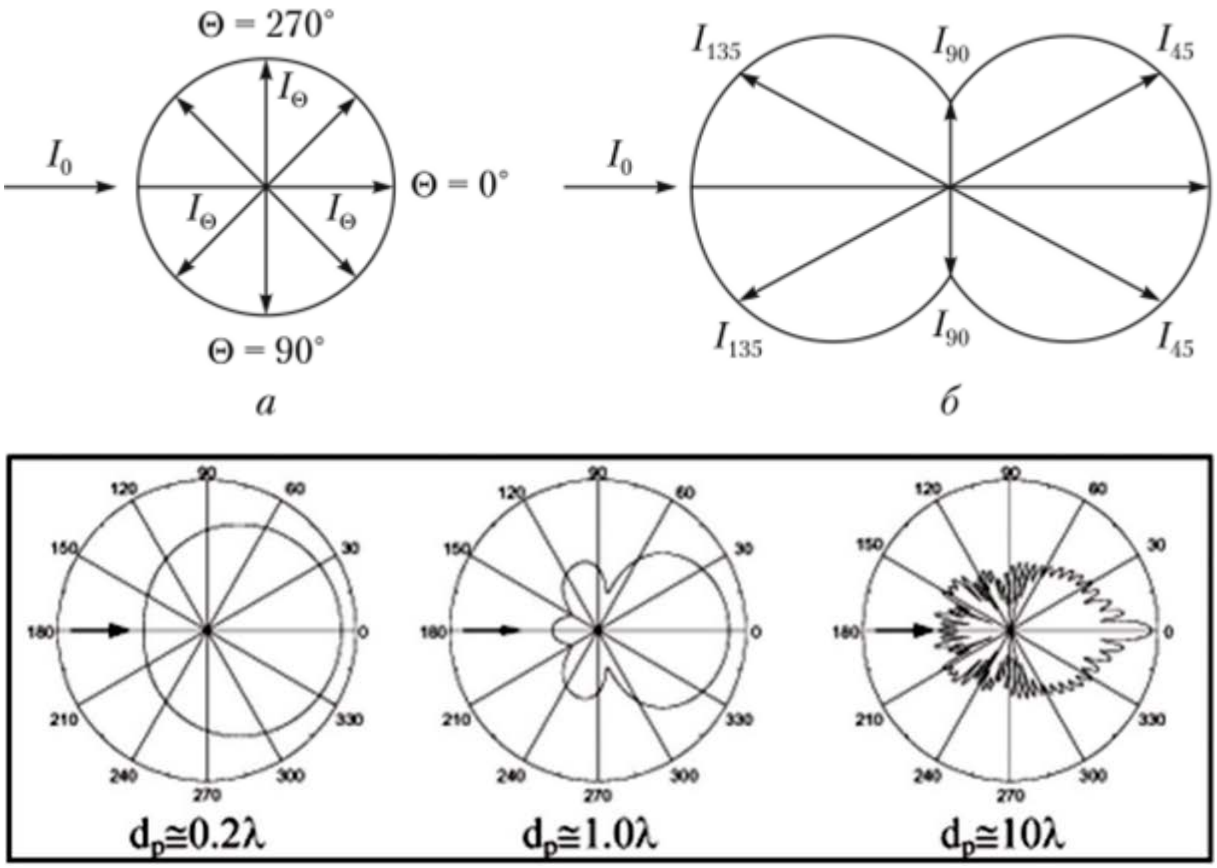


Рис. 2.3 Картины светорассеяния для разных размеров частицы.

Чем больше размер частицы, тем больше этих минимумов и максимумов. Случаи с λ/20 и λ/50 оба находятся в релеевском режиме, для них отсутствует угловая зависимость, но абсолютная интенсивность различается. То есть даже при фиксации релеевского

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

рассеяния, с помощью абсолютной интенсивности возможно получать информацию либо о размере частиц, либо, для полимеров, о молекулярной массе частицы.

Для частиц сильно больших чем длина волны существует угловой зависимость интенсивности рассеяния и для таких частиц сильно больше, чем длина волны существует особый метод измерений размеров - метод лазерной дифракции. Для этого в приборе, основанном на методе лазерной дифракции, установлено достаточно большое количество детекторов, но в достаточно узком диапазоне углов (от -15 до 15 градусов), т.к. для крупных частиц практически вся интересная информация находится в этом узком диапазоне. Получив информацию из этих детекторов, уже по теории дифракции мы можем восстановить по распределению интенсивности распределение частиц по размерам. Еще раз подчеркивая, метод применяется для крупных частиц размерами от 5 микрон до миллиметров. В современных лазерных приборах также стоят дополнительные детекторы для охвата диапазона чуть меньших частиц, в случае которых расчеты производится не по теории дифракции фраунгофера, а по процедуре Ми.

Процедура, или же алгоритм Ми - это, фактически, набор процедур и уравнений, которое позволяет для частицы любой формы (главное, что должны быть известны форма, показатель преломления, коэффициент поглощения частицы и показатель преломления внешней среды, длину волны падающего излучения) мы можем рассчитать интенсивность рассеяния в любом интересующем нас направлении. Процедура Ми в пределе для маленьких частиц приведет к законам релеевского рассеяния, а в пределе для крупных частиц приведет к теории дифракции фраунгофера.

Статическое светорассеяние

Методы, связанные со статическим светорассеянием, применяются для исследования растворов полимеров. На рис.4 представлена схема установки: присутствует лазерный источник с комбинированным пучком, желательно цилиндрическая кювета, образец исследования - фильтрованный (т.к. интенсивность рассеяния сильно зависит от размера частиц, поэтому редкие, но крупные пылинки будут нам вносить значимое искажением в сигнал по интенсивности), устройство под названием гониометр (это “плечо”, позволяющее устанавливать детектор под определённым углом к падающему пучку).

Мы будем с вами регистрировать усредненную по времени интенсивность рассеяния от данного образца под углом Θ, причём мы можем снимать его ещё и для разных концентраций. Рассмотрим такое понятие как рассеивающий объём. Представьте себе, что лазерные лучи — это некий цилиндр, проходящий через образец, и в этом цилиндре частицы рассеивает свет во все стороны. Нам нужно вырезать из этого цилиндра фактически некую область, и делается это при помощи трубчатый диафрагмы, ставящейся на детектор. Это ещё одна фактически виртуальная трубочка, и на пересечении двух этих трубочек у нас оказывается наш рассеивающий объём. Только с

этого объема мы собираем информацию об интенсивности рассеяния, и только лучи под необходимым углом.

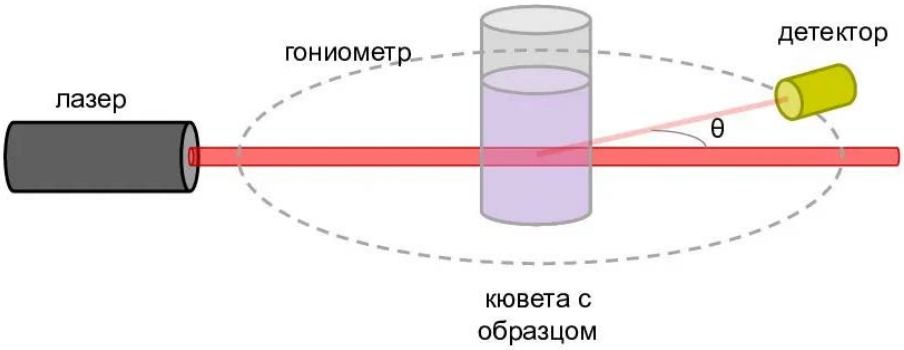


Рис. 2.4 Схема установки

Напомним, что в случае малых частиц характерно релеевское рассеяние, существует угловая зависимость, частица фактически представляет собой осциллирующий диполь, рассеивающий в плоскости свет во все стороны. В настоящее время в качестве источников света используются лазеры, и они поляризованы. Раньше можно было часто встретить неполяризованные источники излучения, и форма рассеивания соответственно для них представляется иначе (помним, что любое излучение можно разложить на сумму вертикальной и горизонтальной поляризации).

Для единичной малой частицы, при рассмотрении лазерное излучение с интенсивностью i0, мы можем узнать, какой диполь она будет возбуждать, используя α (поляризуемость частицы) как такой диполь будет излучать при регистрации на любом угле на расстоянии R от точки регистрации. Получается следующая формула для единичной малой частицы:

$$I_1 = I_0 \frac{\pi^2 \alpha^2}{r^2 \lambda^4}$$

В любой жидкости есть небольшие флуктуации плотности, возникающие случайным образом, имеющие отличающиеся показатели преломления от общего объёма жидкости. На них также рассеивает свет, поэтому перед непосредственным измерением интенсивности рассеяния частиц, необходимо промерить чистый растворитель и вычесть затем его рассеяние.

Дальше необходимо просуммировать для всех частиц, которые присутствуют в общем объеме, и второе, нужно выразить поляризуемость через что-то экспериментально измеряемое. В итоге уравнение приходит к следующему виду:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

$$I_{\text{изм}} = I_{\text{раств}} + I_{\text{расс}}$$

Растворитель также рассеивает излучение благодаря наличию флуктуаций

$$I_{\text{расс}} = \Omega \frac{I_0}{r^2} \frac{2\pi^2}{\lambda^4} \frac{{n_0}^2}{N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \overline{M_w}\, c$$

Ω – приборная константа
I_0 – интенсивность падающего излучения
r – расстояние от рассеивающего объема до детектора
λ – длина волны излучения
n_0 – показатель преломления чистого растворителя
N_A – число Авогадро
$\frac{dn}{dc}$ – инкремент показателя преломления
$\overline{M_w}$ – средневесовая молекулярная масса полимера
c – массовая концентрация полимера (г/л)

K
оптическая постоянная раствора

$$R_\theta = \frac{I_{\text{расс}} r^2}{I_0 \Omega}$$ коэффициент рассеяния (отношение Релея)

Коэффициент рассеяния Релея (отношение Релея) не зависит от расстояния. Необходима абсолютная интенсивность рассеяния, а прибор несовершенен. Во-первых, неизвестен рассеивающий объём, во-вторых, у нас не всегда точно известна мощность лазера, в-третьих, есть некоторые отражения на стенках кюветы, в-четвертых, детектор может считать не 100% фотонов, которые на него приходят. Таким образом, невозможно напрямую измерить абсолютную интенсивность рассеяния. Как в этом случае быть? В кювету помещают какую-нибудь жидкость, у которой флуктуации достаточно сильные, и для которой известно релеевское отношение. Такой жидкостью как правило является толуол. Тогда для исследуемого раствора полимера возможно рассчитывать релеевское отношения.

Показатель преломления чистого растворителя можем измерить на рефрактометре. Инкремент показателя преломления. Для его поиска необходимо приготовить разные концентрации раствора полимера, измерить для них показатели преломления, отложить показатель преломления от концентрации полимера; это окажется прямая линия, и наклон этой прямой линии и будет инкрементом показателя преломления.
После упрощения громоздкое уравнение сводится к компактному виду, интенсивность рассеяния пропорциональна концентрации массовой в граммах на литр и средневесовой молекулярной массе полимера.
Но такое простое уравнение будет действительно только для идеального раствора (полимер, мономер взаимодействуют между собой энергетический ровно также, как мономер и молекулы растворителя, и ровно также как молекулы растворителя взаимодействуют между собой). Это условие соблюдается крайне редко. Для неидеальных растворов действительно уравнению Дебая:

$$\frac{KC}{R_\Theta} = \frac{1}{M_2} + 2A_2C.$$

Необходимо будет измерить интенсивность рассеяния для разных концентраций полимера, отложить на графике концентрации полимера по оси Y у нас Kc деленная на релеевское отношение. Эти точки лягут напрямую; на оси Y будет откладываться единица деленная на средневесовую молекулярную массу, а тангенсу угла наклона будет равен удвоенному так называемому второму вириальному коэффициенту, который как раз и отражает, насколько не идеален раствор полимера.

В этом графике данные экстраполируются на бесконечно разбавленный раствор, таким образом устраняется фактор неидеальности раствора.

У частиц, для которых еще не происходит переход в дифракционный режим, от разных частей молекулы на любом угле будет набегать разность хода. Два фотона будут интерферировать не полностью деструктивно. Угловая зависимость будет уже не симметричной, будет чуть-чуть вытянута вперед, а значит, рассеяние будет происходить на любых углах, кроме угла равного 0 градусов. То есть, когда мы наблюдаем за лучами, которые рассеяны в прямом направлении, то видим, что для них никакой разности хода не будет, и, с одной стороны, это хорошо. С другой стороны, это плохо, потому что угол в 0 градусов мы измерять не можем - там продолжается первичной пучок, тот лазерный луч, который прошел через образец, не взаимодействуя ни с чем.

Поэтому для таких частиц с размерами придется экстраполировать не только к концентрации, но и к нулевому углу, то есть отснять угловую зависимость и ее экстраполировать.

За это мы будем вознаграждены еще одной характеристикой макромолекулы - радиусом инерции макромолекулы. Если есть система материальных точек (это наша макромолекула), то радиусом инерции мы будем называть радиус такой сферы, которая в плане моментов инерции ведёт себя так же, как система материальных точек.

Ранее расчеты проводились с помощью графика Зимма, задача которого состоит как раз в двойной экстраполяции к нулевым углу концентрации. По оси Y откладывается та же величина, что и в графике Дебая - Kc, деленное на релеевское отношения, а по оси X откладывается довольно странная величина - квадрат синуса угла пополам, плюс некая константа, умноженная на концентрацию. Константа выбирается так, чтобы точка для последней, максимальной, концентрации оказалось примерно в районе единицы.

Тогда формируется несколько прямых линий. Из углов наклона получившихся прямых при экстраполяции получаются второй вириальный коэффициент и радиус инерции.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Статическое светорассеяние для частиц размером > λ/20, но < λ/2

$$\frac{K\,c}{R_\theta} = \frac{1}{\overline{M_w}}\left(1 + \frac{16\,\pi^2 {n_0}^2}{3{\lambda_0}^2} \cdot \overline{{R_g}^2} \cdot sin^2\frac{\theta}{2}\right) + 2A_2 c$$

$$R_g = \sqrt{\sum m_i {R_i}^2 / \sum m_i}$$ – радиус инерции макромолекулы

График Зимма:

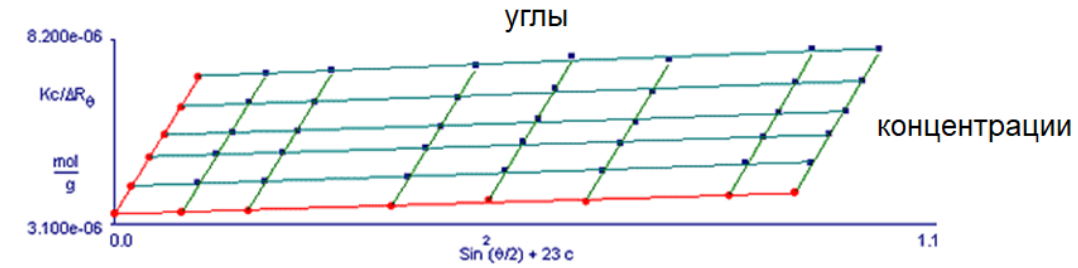


Рис. 2.5 График Зимма

Подведем итог статического светорассеяния: чаще всего оно применяется для растворов полимеров, при этом измеряется зависимость интенсивности рассеяния от концентрации полимера или, для больших частиц, ещё и от угла рассеяния. Для маленьких частиц размером меньше, чем λ/20, получаем средневесовую молекулярную массу и второй вириальный коэффициент, для более крупных частей, в дополнение к этому, еще и радиус инерции макромолекулы. Для надежных измерений раствор необходимо отфильтровать, т.к. крупные частицы вносят большой вклад в интенсивности светорассеяния.

Метод динамического светорассеяния

Как в русскоязычной, так и в англоязычной литературе метод имеет множественные названия, такие как: Dynamic light scattering (DLS), Photon Correlation Spectroscopy (PCS), Quasielastic light scattering (QELS), Динамическое светорассеяние (ДРС), Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС), Динамическая спектроскопия рассеяния света.

Все эти названия действительно отражают различные аспекты метода. Схема установки для данного метода такая же, как и для метода статического светорассеяния, потому что все те же закономерности, которые справедливы для статического светорассеяния, справедливы и для динамического. Частички размером меньше λ/20 не имеют угловой

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

зависимости, для частиц крупнее необходима экстраполяция к нулевому углу; изучаемый коллоидный раствор также может быть неидеальными, и для него также требуется экстраполяция к нулевой концентрации. Тем не менее, в коммерческих приборах зачастую нет гониометра, только детектор, зафиксированный на одном угле (90 градусов, либо в диапазоне 135-145, или даже в обратную сторону под углом 173-178 градусов). Чем это плохо? Из-за крупных частиц возможно возникновения артефакта, который заключается в том, что мы под этим углом, для такого размера частиц, при таком показателе преломления попадаем в минимум индикатриссы. Однако, данная схема сильно упрощает измерения.

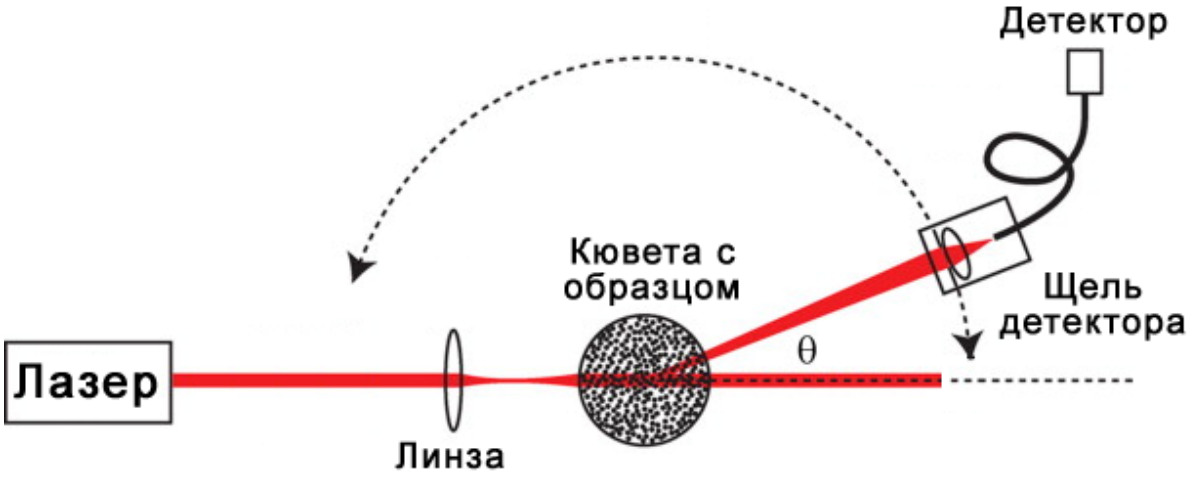


Рис.2.6 Схема установки для метода динамического светорассеяния.

Итак, при статическом светорассеянии на детекторе мы смотрели интенсивность рассеяния, усредненную по достаточно большому промежутку времени: на каждом угле измеряли в течение 30сек-1мин, и смотрели усредненную интенсивности рассеяния. Давайте теперь с этого же образца рассмотрим, как меняется сигнал на маленьких масштабах времени (порядка микросекунд). Мы увидим, что этот сигнал флуктуирует, Флуктуации возникают из-за того, что частицы, находящиеся в рассеивающем объёме, перемещаются в результате броуновского движения. Соответственно, в каждый момент времени они имеют разные пространственной конфигурации, условия конструктивной и деструктивной интерференция постоянно меняется, из-за этого интенсивность рассеяния постоянно флуктуирует.

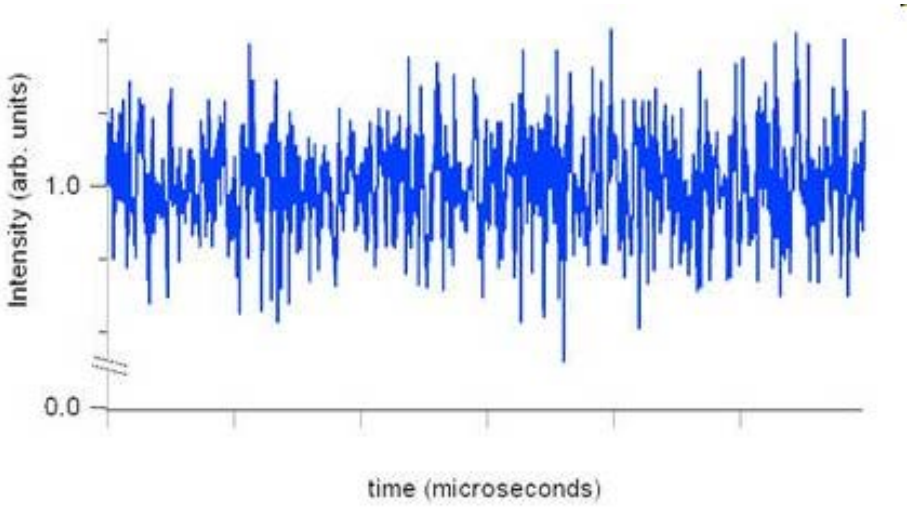


Рис. 2.7 Флуктуации интенсивности рассеянного излучения при временах выборки десятки нс – миллисекунды

Уравнение Эйнштейна-Смолуховского связывает среднеквадратичное смещение с коэффициентом диффузии частиц, причём это (см. далее) одномерный случай.

$$\overline{l^2} = 2\,D\,t$$

Из него следует зависимость: чем крупнее частицы, тем меньше их коэффициент диффузии, тем медленнее движение в результате броуновского движения; чем меньше частицы, тем быстрее их движение и больше коэффициент диффузии. Для мелких, быстро движущихся частиц флуктуации будут частыми, и для крупных частиц будут редкими, этот факт используется в методе динамического светорассеяния.
Как получить из флуктуирующего сигнала какую-то характеристику, соотносящуюся с коэффициентом диффузии или размером частиц? Коэффициент корреляции - показывает степень схожести рядов между собой.

Математическое определение коэффициента корреляции:

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \overline{y})}{(n-1)\,SD(x_i)SD(y_i)}$$

В техническом определении корреляции часто не вычитают среднее и не проводят нормировку на SD $\frac{1}{n}\sum x_i y_i$

Коэффициент корреляции изменяется от -1 до 1. Если коэффициент корреляции = 1, то ряды идентичны с точностью до положительного множителя, если коэффициент корреляции = -1, то ряды всегда меняются в противофазе, т.е. идентичны с точностью до отрицательного множителя, т.е. они идентичны с точностью до отрицательного множителя. И, если R=0, то ряды меняются полностью независимо друг от друга.

При анализе интенсивности рассеяния есть только один ряд (интенсивность от времени), поэтому применяется так называемый автокорреляционной подход. Выбираем время, допустим, с частотой 1 секунда, и сдвигаем ряд относительно самого себя на эту одну микросекунду. Для мелких частиц, флуктуации которых часты, мы видим, что сдвиг на 1 микросекунду сигнала относительно себя самого делает точки, соответствующие одному и тому же времени, уже мало похожими, коэффициент корреляции низкий. Для крупных частиц при сдвиге в 1 микросекунду в рядах данные всё ещё сильно похожи друг на друга. Теперь проведем аналогичные расчеты не только для 1 микросекунды, а для разных времён сдвига, для каждого сдвига будем рассчитывать коэффициент корреляции, и тогда получим затухающие функции (рис. 8). Для крупных частиц автокорреляции будут спадать медленно, для мелких частиц - быстро.

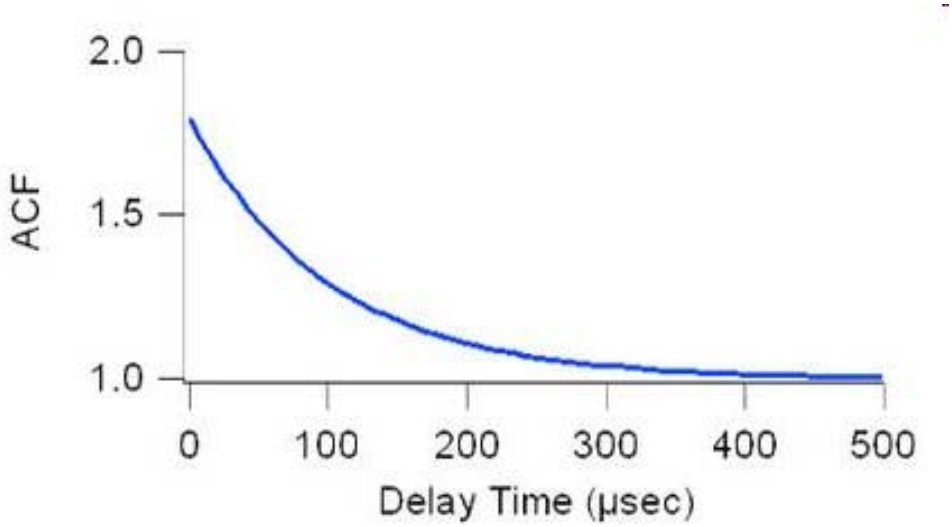


Рис. 2.8 Зависимость автокорреляции от времен сдвига (времен задержки).

Данные в реальном времени обрабатываются с помощью специальной платы - автокоррелятора. Для данной интенсивности еще не известны среднее, стандартное отклонение (они появляются после расчета автокорреляционной функции). Сначала нам придется разделить это на квадрат средней интенсивности (когда данные снимались, скажем, полминуты-минуту). Таким образом, мы сами получаем так называемую автокорреляционную функцию второго порядка.

$$g^2 = \frac{\overline{I(t)I(t+\tau)}}{\overline{I(t)}^2}$$

$$g^2 = 1 + \beta\,(g^1)^2$$

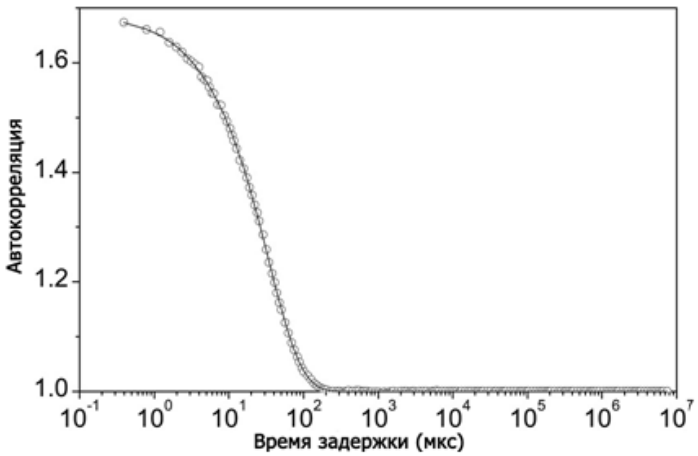


Рис. 2.9 График автокорреляционной функции второго порядка

Для перехода к пропорциональности первой степени интенсивности используются бета (в уравнении выше) — это некая приборная константа, которая зависит от рассеивания, объема, геометрии измерения, всегда меньше единицы, и всегда известна для прибора.

Интерпретация автокорреляционной функции

Если в растворе присутствуют частицы строго одного и того же размера, то:

$$g^1 = \exp(-\Gamma\,\tau) = \exp(-q^2\,D_t\,\tau)$$

где D_t – коэффициент диффузии, q – волновой вектор.

$$q = \frac{4\,\pi\,n_0}{\lambda}\sin\frac{\theta}{2}$$

Тета – угол рассеяния
Эта – показатель преломления
Лямбда – длина волны источника

По закону Стокса:

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

k – константа Больцмана
T – абсолютная температура

тета – динамическая вязкость
Rh – гидродинамический радиус

Если в растворе присутствуют разные частицы, то автокорреляционная функция представляет собой сумму (вернее, интеграл) экспонент от каждой фракции:

$$g^1 = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} \mathrm{G}(\Gamma)\,\exp(-\Gamma\,\tau)\,d\Gamma = \int_{D_{min}}^{D_{max}} \mathrm{Z(D)}\,\exp(-q^2\,D\,\tau)\;\,dD$$

Z(D) – вклад по интенсивности рассеяния.

Различные методы интерпретации автокорреляционной функции

А) Метод кумулянтов:
Разложение этой функции в ряд:

$$g^1 = \exp(-\bar{\Gamma}\,\tau)\left(1 + \frac{\mu_2}{2!}\,\tau^2 + \ldots\right)$$

Ограничение двумя первыми членами:

1) $\bar{\Gamma} = q^2\,\bar{D}$ - взвешенный по интенсивности рассеяния средний коэф. диффузии, из него рассчитывается т.н. z-средний размер.

2) Ширина распределения $\mu_2/\bar{\Gamma}$, т.е полидисперсность частиц

Б) Алгоритм CONTIN:
Регуляризация, затем решение обратной задачи:

$$g^1 = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} \mathrm{G}(\Gamma)\,\exp(-\Gamma\,\tau)\,d\Gamma = \int_{D_{min}}^{D_{max}} \mathrm{Z(D)}\,\exp(-q^2\,D\,\tau)\;\,dD$$

Задача плохо обусловлена (маленькие возмущения АКФ приводят к очень различным решениям). Требуется регуляризация.

Ограничения, накладываемые при интерпретации АКФ:

1) Неотрицательность Z(D)
2) Минимальное соотношение Γ соседних фракций (соотношение соседних фракций должно быть как минимум 2:1)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Из этой АКФ получаем график (рис.2.10), где положение характеризует размер, а множители характеризуют высоту столбиков.

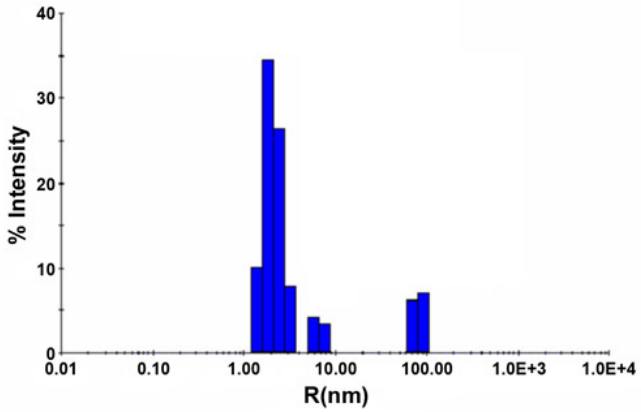


Рис. 2.10 График АКФ

Полученное распределение частиц является эффективным, а не реальным, т.к. мы наложили довольно не физическое ограничение два к одному для фракций. Распределение известно по интенсивности; то есть высота каждого столбика для каждой фракции даёт нам долю по интенсивности рассеяния, а не по числу частиц, как нам бы хотелось. К тому же мы с вами уже помним, что крупные частицы рассеивают сильно больше, чем мелкие частицы, и когда частица меньше чем лямбда на 20, то зависимость интенсивности рассеяния от размера вообще - 6 степень (т.е. очень резко растет); для диапазона от лямбды на 20 степень пониже - от 4 до 6. Тем не менее, зависимость все равно степенная.

Таким образом, метод динамического светорассеяния чрезвычайно чувствителен к крупным частицам, таким как пылинки, агрегаты и так далее. Образцы требуется фильтровать.

Метод динамического светорассеяния будет слеп к мелким частицам на фоне крупных. Представим две фракции - 10 нм и 100 нм, отношение размеров у них - 100:10, и отношение интенсивности рассеяния будет 10-6 (в 1 млн раз различаются). Мы можем спокойно упустить мелкую фракцию, если только она не во много-много раз больше по числу частиц, чем крупная фракция, и чем больше разница по размерам, тем проще нам её будет упустить.

Во многих программах управление приборами и во многих статьях встречается пересчет полученного распределения по числу частиц или по объёму. Формально, это действительно можно сделать, однако многие эксперты считают, что это практически бесполезная процедура. Чтобы пересчитать распределение по числу частиц либо по объёму, нам нужно, во-первых, знать оптические свойства материала частиц и среды, показатель преломления частиц, коэффициент поглощения частиц, коэффициент преломления среды, нужно знать параметры прибора, длину волны лазера и угол

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

рассеяния. В приближении сферических частиц, по упомянутым уже алгоритмам Ми, для каждого столбика, для каждого размера частиц надо рассчитать интенсивность рассеяния под углом измерения, разделить одно на другое и получить, формально, распределение по числу частиц. Какие недостатки? Во-первых, исходное распределение было эффективным, то есть оно могло бы быть и совсем другим. После пересчета может получиться совершенно бессмысленная информация. Во-вторых, если мелкая фракция была потеряна по интенсивности, то и при пересчете она не появится. Третье, часто оптические свойства частиц неизвестны, за исключением исследования стандартных образцов типа латекса, определенных белков и тд. Итого, формально возможно пересчитать распределение с интенсивности на частицы, но практически - почти всегда в этом нет смысла.

Итого, ограничения метода динамического светорассеяния:

- Распределение взвешено по интенсивности рассеяния

Возможен пересчет распределения в объемное или числовое по теории Ми, зная оптические свойства материала частиц и жидкости (коэффициент преломления и поглощения)

- Высокая чувствительность к крупным частицам (пыли, крупным агрегатам)

А) Фильтрование растворов перед измерением через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм

Б) Выполнение серии коротких измерений ACF с удалением выбросов и последующим усреднением

- Низкое разрешение по размерам

Теоретическое 1:2, практическое 1:2.5-3

Гидродинамический размер, точнее - эквивалентный сферический гидродинамический диаметр. Что это такое? Это размер такой сферы, которая движется через растворитель также как и реальная частица (может неправильной формы). Например, если у нас в растворе присутствует частицы, собравшиеся в небольшие агрегаты по 2-3-4 частицы, то такие олигомеры будут двигаться через раствор как единое целое. Растворитель может не только обтекать агрегат, но и протекать сквозь него. Таким образом, для полимера эквивалентный физический диаметр может быть крайне небольшим (и будет двигаться через жидкость так же, как маленькая частичка). Эквивалентный диаметр будет сильно меньше геометрических размеров.
Также к размеру частицы добавляется всё, что движется вместе с частицей как единое целое. Так могут двигаться адсорбированные на поверхности частицы небольшие молекулы.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

К истинному размеру частицы добавляется “прибавка” двойного электрического слоя, причем с двух сторон: к радиусу один раз, к диаметру дважды (рис. 2.11).

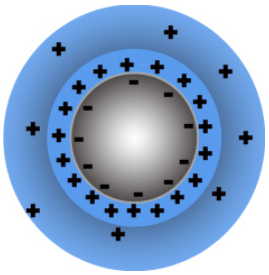


Рис. 2.11 Двойной электрический слой частицы

Измеряемые диапазоны для метода

- Размер частиц – от 0.5 (реально 2-5) нм до 6 (реально 2-3) мкм

-«Маскирование» мелких частиц крупными
-Только диффузионное движение частиц (не должно быть седиментации или конвекции)
-Чем меньше размер частиц, тем выше должна быть концентрация

- Концентрации частиц

Подбирается индивидуально под образец
-Низкая концентрация – долгое измерение
-Высокая концентрация – многократное рассеяние, занижение размера

Динамическое светорассеяние: резюме
- может применяться для полимеров, в т.ч. био наночастиц
- первичный измеряемый параметр – автокорреляционная функция
- путем ее интерпретации получаем эквивалентный сферический гидродинамический диаметр
- хорошо подходит для узких распределений дисперсности
- множество «подводных камней» и ограничений

Метод анализа траектории наночастиц.

Возьмём относительно разбавленный коллоидный раствор и пропустим через него относительно толстые, с размерами порядка долей миллиметра, лазерный луч, под 90 градусов поставим объектив, и мы получим картину (рис.2.12).

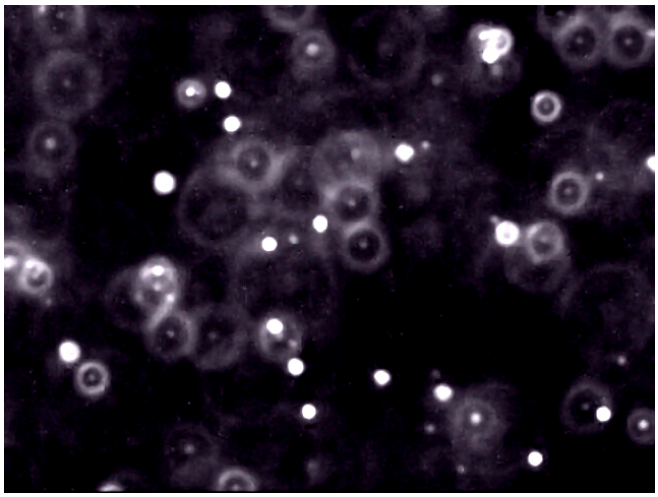


Рис. 2.12 Ультрамикроскопия наночастиц с круглым лучом лазера

На изображении, помимо четких пятен, видны пятна с дифракционными кольцами, и такие пятна трудно обрабатывать программами. Они возникает из-за того, что частица находится либо сильно ниже фокуса, либо сильно выше фокуса. Поэтому необходимо модифицировать прибор.

Теперь лазерный луч будет плоским, его толщина примерно равна глубине фокуса объектива (порядка 10 микрон). В таком случае все частицы, находящиеся вне фокуса, и не будут светиться, не попадая под лазерный луч (рис. 2.13). В этих условиях мы получим другое изображение (рис. 2.14). Если все пятна относительно четкие, то программное обеспечение в автоматическом режиме может их выделять и находить центр. Сами частички могут быть маленькими (порядка 40-50 нм), размер пятна гораздо больше (около 35 микрон).

Теперь сделаем не одну фотографию, а запишем видео, на котором мы увидим броуновское движение этих пятен. На отдельных кадрах можно выделять центры этих пятен и напрямую измерять характеристики броуновского движения.

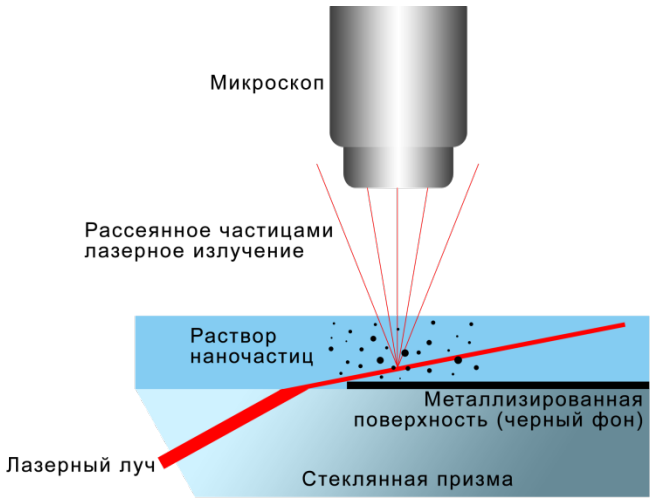


Рис. 2.13 Схема установки

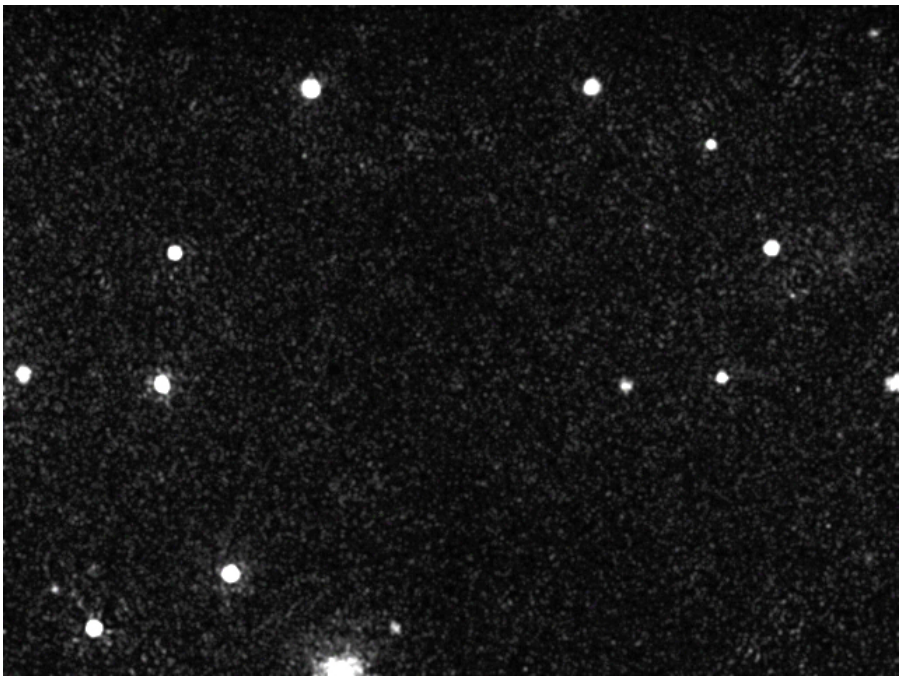


Рис. 2.14 Изображение, полученное с помощью плоского луча лазера

Анализ траекторий наночастиц
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Частицы в растворе постоянно движутся (Броуновское движение)

Уравнение Стокса-Эйнштейна (двумерный случай):

$$\overline{r_{x,y}^2} = \frac{2\,k\,T\,t}{3\,\pi\,\eta\,r_{частицы}}$$

t – время наблюдения

$\overline{r_{x,y}^2}$ – средний квадрат пройденного расстояния за время t

T – температура

η – вязкость растворителя

k – постоянная Больцмана

Процедура анализа: записывается видео, выделяются частицы и их траектории, возводим длины всех шагов за время t в квадрат, усредняем, рассчитываем гидродинамический размер и далее суммируем их в виде гистограммы распределения частиц по размерам.

Размер области наблюдения известен (глубина и площадь), как и число подсчитанных частиц. Имея эти данные, можно посчитать количество частиц в миллилитре.

Диапазон допустимых концентраций для метода: 10^7 – 10^9 частиц/мл.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Существует **нижняя граница детекции по размерам**. У нас есть по закону Релея интенсивность рассеяния, есть некая приборная константа, есть некая часть, зависящая от показателя преломления, D в 6 степени. Если взять частицы, состоящие из одного и того же материала, и понижать их размер, то интенсивность рассеяния будет резко падать, при определенном размере она упадет ниже чувствительности камеры - такая частица не может быть детектирована. Где проходит этот размер, зависит от множителя Ri: при большем Ri это происходит при меньшем размере и наоборот. Это называется относительная рассеивающая способность материала. Диапазон измеряемых размеров зависит от образца:
от 10 нм до 2 мкм.

Закон Рэлея:

$$I = I_0 \frac{1+\cos^2\theta}{2R^2}\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4\left(\frac{n^2-1}{n^2+2}\right)^2\left(\frac{d}{2}\right)^6$$

$$I \sim d^6 R_i \qquad R_i = \left(\frac{n^2-1}{n^2+2}\right)^2$$

«Тонкости» метода:

- в результате разведения измеряемые частицы в образце содержатся в концентрации ~10^8 частиц/мл
  - нельзя загрязнять образец примесными частицами
  - нельзя терять частицы, например при долгом хранении из-за адсорбции на стенках
- из-за случайного характера Броуновского движения необходимо собирать информацию о большом кол-ве частиц с большого числа порций образца
- полученное распределение частиц по размеру «уширено» за счет эффекта конечности длин траектории

Достоинства метода

- Наглядность и достоверность. Как минимум, по концентрации. Счетный базис распределения.
- Метод NTA дает более близкое к реальному распределение частиц по размеру, а не эффективное, как в DLS. Возможен анализ как мономодальных систем с узкими пиками, так и сложных полидисперсные систем с близкими по размеру фракциями.
- Не требуется знание коэффициента преломления частиц
- Значительно меньше, чем в DLS, мешающее влияние частиц пыли
- Одновременное измерение как размера, так и концентрации частиц
- Возможность расширенной интерпретации данных

Ограничения метода

- В диапазон измерений (от 10-25 нм) не попадает ряд важных объектов нанотехнологии и биохимии: квантовые точки, малые Au и Ag наночастицы, белковые олигомеры и т.п.
- Необходимость разведения образца
- Также, как и в DLS – эффективный сферический эквивалент

Анализ траекторий наночастиц: резюме

- Применяется для наночастиц
- Прямое измерение счетного размера частиц и концентрации
- Высокая визуальность метода
- Подходят для узких и широких распределений
- Распределение уширено за счет эффекта конечности длин траектории
- Существуют ограничения по размерам частиц
- Необходимо сильно разбавлять измеряемые образцы, невозможно измерять лабильные образцы

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 3

Лекция посвящена спектроскопия кругового дихроизма и его применению в биотехнологии.

О спектральных методах

Наиболее распространенными в лабораториях методами исследования биологических объектов являются спектроскопии и рентгеноструктурный анализ. Рентгеноструктурный анализ дает исчерпывающую информацию о структуре молекулы белка и других полимеров, но только в кристалле. В повседневной жизни этот метод применяется редко, т.к. процедура выращивания является трудной и долгой, и даже с выращенным кристаллом не всегда получается получить трехмерную структуру высокого разрешения. Сейчас несколько тысяч белков имеют разрешенную 3D структуру за счет метода рентгеноструктурного анализа.

Но сегодня мы будем говорить о применении спектральных методов для исследования структуры биополимеров, в первую очередь - белков. Чем эти методы хороши, и чем плохи?

Они не дают детальную информацию, однако все равно мы можем многое узнать: изменение структуры белка при изменении условий, при связывании с мембраной, при взаимодействии с лигандами, при взаимодействии с ингибиторами, при любом процессе вроде денатурации, и как раз эти положения нам с вами необходимы при изучении структуры ферментов в биотехнологии. То есть в основном мы смотрим за изменениями и количественными характеристиками.

Какие количественные характеристики с помощью спектроскопических методов можно определить?

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии позволяет определять термодинамические параметры конформационных переходов в белках. В процессе измеряется зависимость теплоемкость от температуры, получая кривую - термограмму. На термограмме белка, к примеру, можно ожидать увидеть пик, который соответствует фазовому переходу из полностью свернутого в полностью развернутое состояние. Возможно определить параметры полуперехода, дельта Н и др термодинамические параметры. Энтальпия фазового перехода по термограмме определяется как интеграл кривой. Если структура является мультидоменной, тогда мы увидим несколько пиков, если они разрешимы. Тогда оказывается, что домены разделяются по температуре фазового перехода. Существуют каталитические и структурные домены. Каталитические домены независимо плавятся, обладают каталитической активностью, структурные домены также независимо плавятся и независимо сворачиваются. Таким образом возможно провести отжиг (при разных температурах плавления, избирательно плавятся одни домены, и тогда можно изучать отдельно каталитические особенно оставшихся).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ИК-спектроскопия - также высоко информативный метод, который позволяет определять вторичную структуру, следить за агрегацией, определять концентрацию белка в системе. У белков есть характеристические полосы Амид 1 и Амид 2, которые соответствует поглощению ИК области пептидных связей, которое прямо пропорционально концентрации белка. Таким образом мы можем анализировать содержание белка в самых различных, в т.ч. сложных системах: в непрозрачных мутных средах, в крови, в пищевых продуктах (шоколаде, мармеладе, зефире, пенах и так далее), на поверхности раздела фаз, гелях, целых липосомах, в системе клеток и так далее. Вы смотрите интересующий пик, как он изменяется в процессе того или иного взаимодействия, определяете вторичную структуру и связывание с различными лигандами. Метод имеет ключевое значение для исследования биомолекул, и, в первую очередь, вторичной структуры белка количественно: соотношение в белке альфа спиралей, бета структур, рандомных структур, бета поворотов, а также можно следить за третичной структуры белка, наблюдая за изменением ИК спектров в ближней области (за поглощение в ближнем ИК спектре отвечают триптофан, тирозин, в меньшей степени фенилаланин).

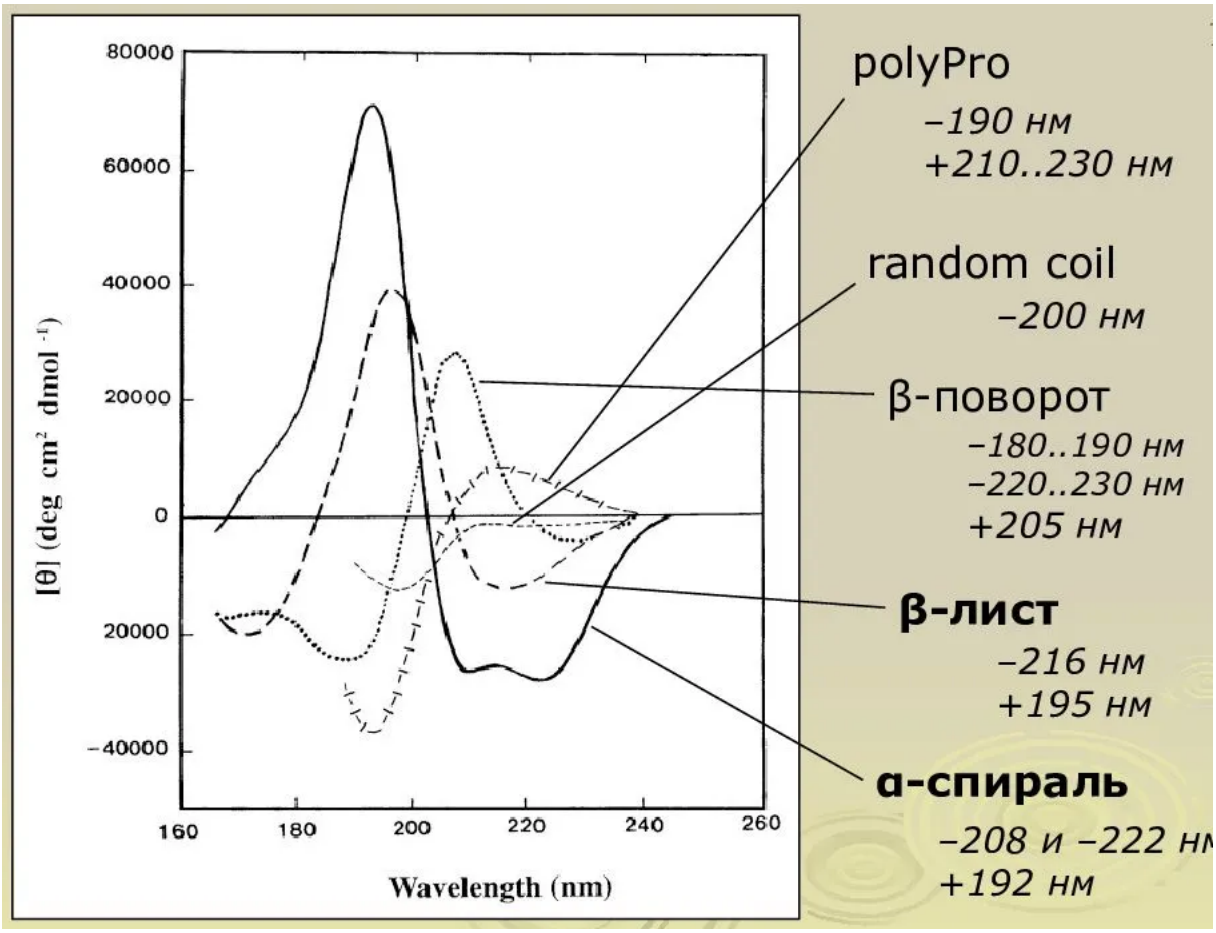


Рис. 3.1 Пример исследования вторичной структуры с помощью поглощения света

Рис. 3.2 Виды излучений и изменение их характеристик

Абсорбционная спектроскопия

С ее помощью возможно узнать концентрацию вещества (у каждого имеется коэффициент молярного поглощения, и путем построения калибровочных кривых, можно измерить концентрацию). Также определяется каталитическую активность ферментов по изменению оптической плотности в процессе гидролиза субстрата или за счет образования продуктов. Метод абсорбционной спектроскопии может быть чувствительным к изменению третичной структуры белка, например при переходе из водной среды в мицеллярную систему или водно-органический растворитель, где белки катализируют реакции тонкого органического синтеза ферментов. Наблюдаются сдвиги хромофоров белка (хромофоры белка это, в первую очередь, ароматические аминокислотные остатки триптофан и тирозин) в ту или иную область спектра при изменении третичной структуры.

Самый простой метод — это спектрофотометрия, основанная на том, что падающее излучение поглощается образцом. Имеется кювета, ее длина, и, соответственно, длина оптического пути обозначается l (составляет обычно 1 см). Измеряется T (это пропускание - transmittance), означающее отношение прошедшего излучения к падающему и представляет собой экспоненциальную зависимость.

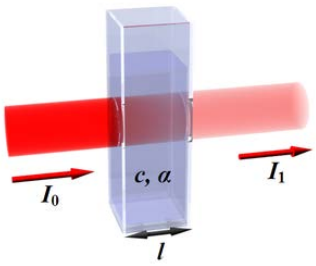


Рис. 3.3 Пропускание пучка света через кювету

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-kcl}$$

I – пропускание (transmittance)

$$-lgT = A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = kcl$$

A – оптическая плотность (absorbance)

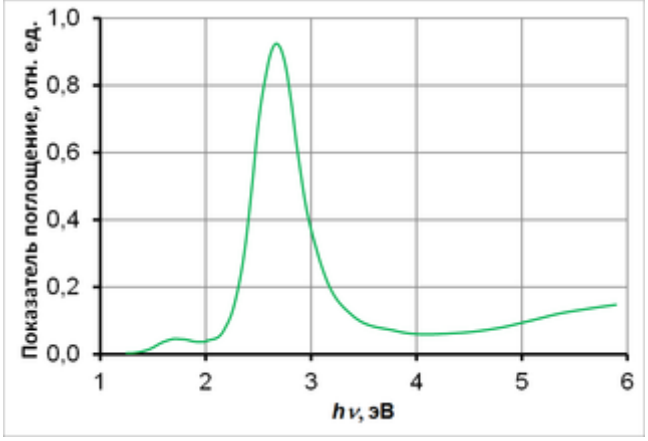


Рис. 3.4 Пример спектра поглощения

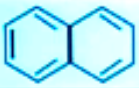
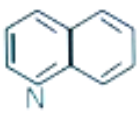
Хромофор	Структура	λ_{max}
Бензол		184, 202, 255
Пиридин		174, 195, 251
Нафталин		220, 275, 285, 312, 320
Хинолин		227, 270, 300, 313

Рис. 3.5 Примеры хромофоров

Закон аддитивности оптических плотностей

Оптическая плотность - экстенсивное свойство вещества. Поглощение света каким - либо веществом не зависит от присутствия в растворе других веществ, и оптическая плотность смеси веществ равна сумме оптических плотностей каждого из них. Это

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

справедливо при условии подчинения каждого вещества закону Бугера - Ламберта - Бера и в отсутствие химического взаимодействия между ними. Итак, для смеси m веществ при одной и той же длине волны имеем:

$$A = A1 + A2 + ... + Am$$

$$A = \sum_i A_i = l \sum_i \varepsilon_i c_i$$

Анализ белков

В ультрафиолетовой области поглощают пептиды, точнее сказать, их карбоксильные группы, двойные связи, ароматические аминокислотные боковые радикалы, такие как тирозин, фенилаланин, и в наибольшей степени триптофан (поскольку он имеет наиболее резонансную структуру). Кроме того существуют небелковые простетические группы, такие как гем, флавинадениндинуклеотид (ФАД), комплексы меди, вольфрама и молибдена. Ароматические боковые радикалы аминокислот обеспечивают каждому белку собственный спектр поглощения в ближней области. Наиболее селективно возможно наблюдать за триптофаном.

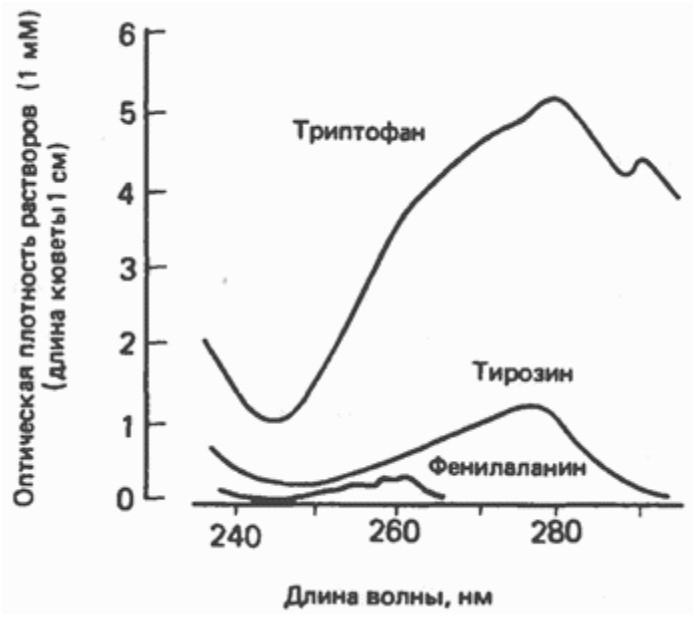


Рис. 3.6 Спектры поглощения ароматических аминокислот

Дифференциальная абсорбционная спектроскопия

С помощью спектрофотометра можно определить тонкие изменения в структуре белка за счёт того, что при взятии четвертой производной из изначального спектра становятся разрешимыми те пики, которые были ранее невидимы. Таким образом можно получить кривую, построив зависимость положений пиков четвертой производной от давления, и эта кривая будет похожа на кривую денатурации. Отсюда можно посчитать параметры фазового перехода под действием сверхвысоких давлений.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Пример использования дифференциальный спектроскопии в медицинских целях.

Спектроскопия используется для диагностики различных заболеваний. Спектр флуоресценции соединительной ткани кишечника состоит из нескольких компонентов: спектров флуоресценции ФАД, НАД и коллагена. Измеряемый спектр с помощью компьютерного моделирования возможно разложить на три компонента. Соотношение этих компонентов связано с нарушением (или же наоборот нормой) состояния больного при различных стадиях поражения слизистой оболочки желудка. Такой способ может использоваться для ранней диагностики поражения слизистой оболочки желудка и других эпителиальных тканей.

Метод кругового дихроизма

Прибор для метода выглядит как обычный спектрофотометр, но позволяет получать действительно многогранную информацию, начиная со вторичной структуры белка, заканчивая проведением кинетических измерений, определением каталитической активности, определением содержания, качества и количества низкомолекулярных хиральных соединений в разных системах, в т.ч. лекарственных.

Плоско поляризованная электромагнитная волна распространяется и осциллирует в определенной плоскости. Она распространяется со скоростью света во времени в пространстве; представляет собой осциллирующие векторы E и H, находящиеся перпендикулярно. Их суперпозиция, при условии равенства векторов по амплитуде и синхронности, будет тоже плоскополяризованный волной, направленной, по правилу векторного сложения, под 45 градусов.

Если же разность фаз не равна 0, то суперпозиция не будет плоско поляризованный волной, она будет описывать спираль, право- или левозакрученную, и в сечении мы будем наблюдать круговое вращение с постоянной амплитудой. Такая волна называется циркулярно поляризованной. Она может быть направлена вправо (разность фаз =+90 градусов) и влево (-90 градусов).

Если совместить суперпозиции двух противоположно направленных циркулярно поляризованных волн с одинаковой амплитудой и с разностью фаз равной нулю, то они превращаются в плоско поляризованного волну (в два раза больше исходной). Верно и обратное: одну плоско поляризованную волна можно разложить на две компоненты - право и левозакрученные циркулярно поляризованные волны. Это довольно важный момент.

Теперь мы рассмотрим взаимодействия волн с материей. Первый вариант — это поглощение света, то есть снижение интенсивности в результате прохождения через образец. Интенсивность прошедшего света падает с экспоненциальной зависимостью вот от длины оптического пути, и разность фаз не изменяется, она равна нулю, ведь синхронно изменяется только интенсивность, это и будет поглощением. Второй

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

вариант - поглощение света не происходит, а происходит преломление. При прохождении через образец скорость распространения электромагнитной волны уменьшается в зависимости от коэффициента преломления (коэффициент больше единицы). Изменяются скорость распространения волны, уменьшается длина волны, период увеличивается, изменяется разность.

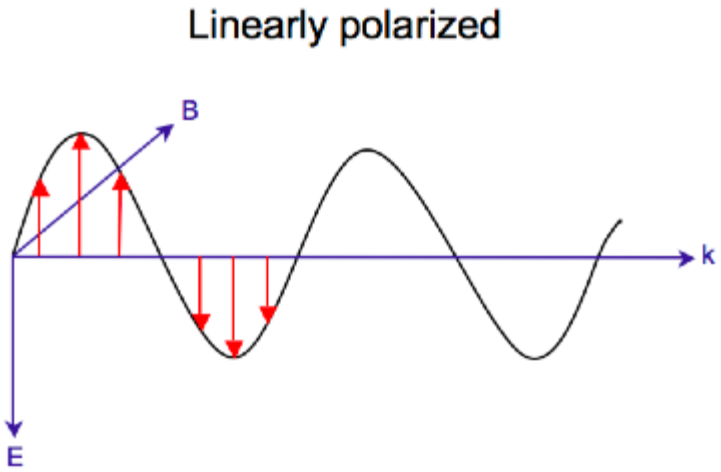


Рис. 3.7 Линейно поляризованная волна

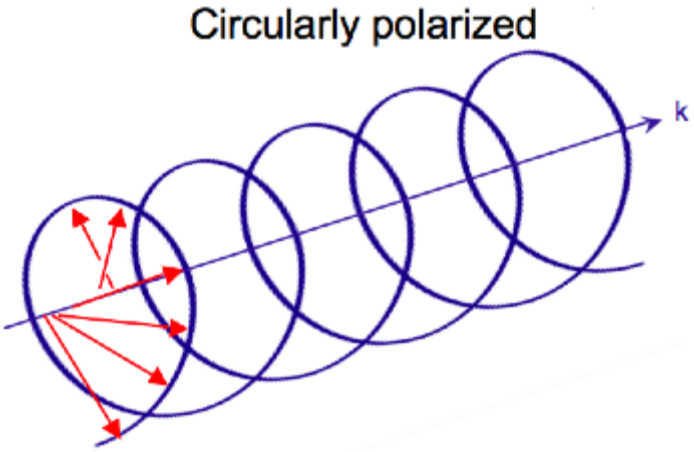


Рис. 3.8 Циркулярно поляризованная волна

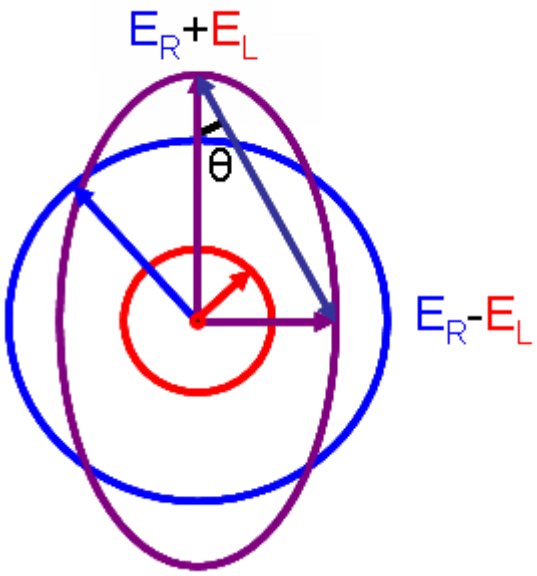


Рис. 3.9 Эллиптический поляризованный свет (фиолетовый), состоит из неравных вкладов справа (голубой) и левый (красный) круговой поляризации света.

Круговой дихроизм

Как уже упоминалось, мы можем разложить плоскополяризованную волну на две компоненты - право и левополяризованную. Может оказаться так, что одну из компонент материал поглощает, а другую нет. На выходе не будет больше плоско поляризованной волны, так же как и не будет циркулярно поляризованный, а будет эллиптически поляризованная, причём более длинная ось будет совпадать с направлением исходной электромагнитной волны, а крутится будет в сторону, той компоненты которая меньше поглощается.

Итого, круговым дихроизмом — это явление, при котором один из компонентов электромагнитной волны поглощается в большей степени, чем другой.

При двойном лучепреломлении плоско поляризованная волна меняется, становится эллиптически поляризованной, при этом эллиптичность будет пропорциональна соотношению длинной и короткой оси. Эффект двойного лучепреломления состоит в том, что одна компонента остается без изменения, а вторая меняет фазу, т.к. претерпевает изменение скорости распространения. В итоге меняется угол поляризации, и этот угол тоже является аналитическим сигналом, который необходимо измерять для определения оптической активности различных материалов .

Спектроскопия кругового дихроизма. Основы метода

Хиральные молекулы существуют в 2 различных зеркальных конфигурациях. Круговой дихроизм помогает нам определить количественно меру оптической активности. Есть два вида приборов, проводящих соответствующие измерения: один измеряет разницу поглощения право и лево закрученной волны, а другой преломление (изменения

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

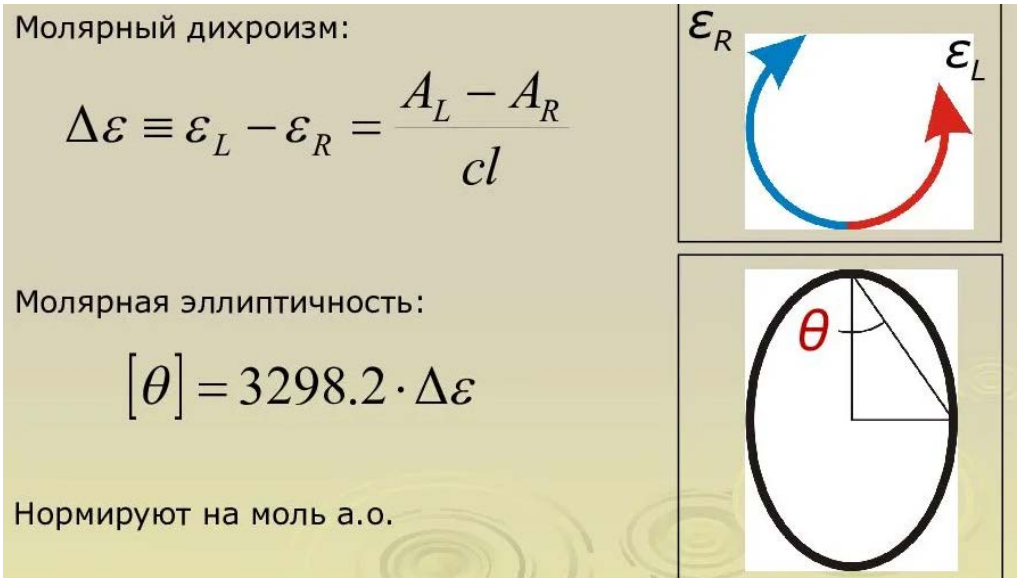
плоскости поляризации). Круговой дихроизм позволяет определять точно определять вторичную структуру белка. Вы можете довольно быстро и просто узнать, как изменилась структура белка после изменения, например, pH или при добавлении субстрата или ингибитора (может происходить агрегация, удаление ФАД и т.д.), не используя рентгеноструктурный и т.п. анализы. Аналитический сигнал — это разница между поглощением лево и право циркулярно поляризованного света, т.е. измеряемым параметром является угол между более длинной и более короткой осью.

Дельта абсорбция

По определению,

$$\Delta A = A_L - A_R$$

где ΔA (Дельта Абсорбция) представляет собой разность между поглощением левой круговой поляризацией (ЛКП) и правой круговой поляризацией (RCP) света (это то , что обычно измеряется). ΔA является функцией длины волны , так что для измерения , чтобы иметь значение длины волны, при которой она была выполнена, должны быть известны.



Молярная эллиптичность белков в пересчете на аминокислотный остаток:

$$[\theta]_{mrd} = \frac{\psi \cdot M_p}{10 n_r c_p l} = \frac{\psi \cdot \overline{M_r}}{10 c_p l} \quad \text{units: deg cm}^2\ \text{dmol}^{-1}$$

Хиральность в аминокислотах.

Как мы знаем, единственная оптически неактивная аминокислота — это глицин, т.к. не четыре атома углерода одинаковые, а только три.

Необходимы два условия, чтобы увидеть спектр КД. Первое, это наличие хиральности в молекуле. Второе, это наличие хромофора в молекуле. У всех аминокислот есть хромофоры: за счет аминогруппы и карбонильная связи образуется амидная связь, она поглощает у нас в области 200-210 нм. Интенсивности и форма этого поглощения зависит от состояния белка. В ближнем УФ поглощают вот эти двойные связи и только, а в 270-280 поглощают ароматические остатки.

Вернемся к хиральности аминокислот. Есть такой фермент, аспарагиназа, он катализирует реакцию гидролиза аспарагина до аспартата и иона аммония. У аспарагиновой кислоты и аспарагина разные спектры, т.е. при реакции возможно померить увеличение сигнала аспарагиновой кислоты на длине волны 210 нм (иногда берут 205 нм, но сигнал получается более зашумленным). Этот эффективный и селективный метод определения каталитической активности особенно важен для тех ферментов, у которых нет окрашенных продуктов. Получаются кинетические кривые зависимости сигнала на определенной длине волны от времени, а тангенс наклона будет являться скоростью реакции.

Что ещё интересного можно сказать про аналитические приложения метода.

Есть такой биополимер – хитозан - широко используемый в медицинской промышленности, как загуститель, носитель для лекарственных средств высокой и низкой плотности и тд. Он представляет собой продукт частичного дезацетилирования хитина.

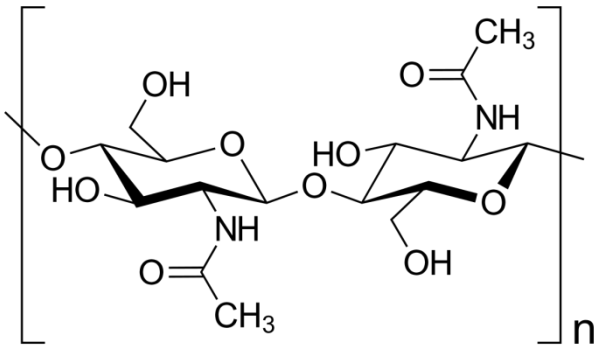


Рис. 3.10 Хитозан

Степень дезацетилирования является важным параметром, определяющим растворимость, наличие заряда, полиэлектролитные свойства для связывания веществ, гелеобразование. Степень дезацетилирования можно определить с помощью метода кругового дихроизма, т.к. на длине волны 210 нм поглощают N-ацетил-глюкозамидные связи, и аналитический сигнал будет пропорционален их содержанию. Используя эталонное значение эллиптичности для хитозана с DD=0% (у хитина), определяют степень деацетилирования, которая составляет обычно около 90%.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Другой пример - фторхинолоны — это антибактериальное средство широкого спектра действия против туберкулёза, бронхита, пневмонии, многих мочеполовых заболеваний. Они тоже имеют оптическую активность, потому что у них есть целый ряд хиральных атомов углерода.

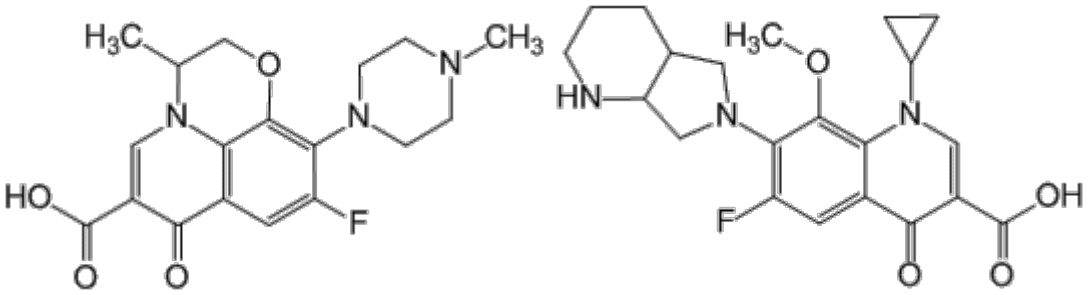


Рис. 3.11 (а) Левофлоксацин (б) Моксифлоксацин

Они имеют свой спектр КД и будут поглощать в ближней УФ области (за счет ароматического ядра).

Спектры поглощения можно использовать, чтобы следить за состоянием лекарства (испортилось или нет), за его концентрацией в крови, за степенью связанности и включенности в липосомы, хитозан и тд. Аналитический сигнал пропорционален концентрации вещества.

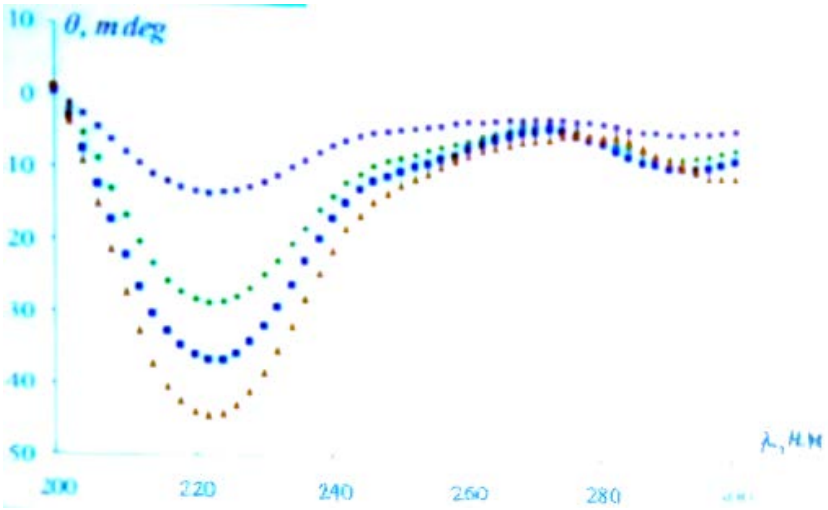


Рис. 3.12 КД спектр моксифлоксацина

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

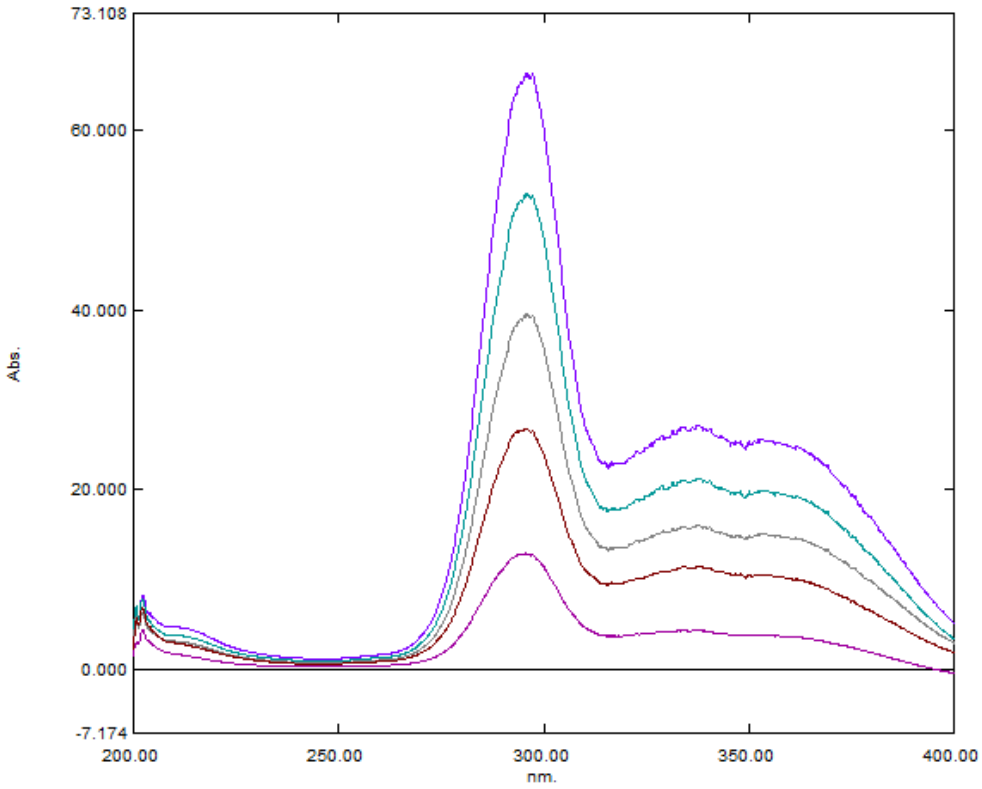


Рис. 3.13 Спектр поглощения моксифлоксацина

Циклодекстрины — это циклические олигосахариды, состоящие из модифицированных остатков глюкозы с определенными альфа, бета, гамма заместителями. Они различаются числом глюкозных остатков, соответственно размером внутренней полости. Циклодекстрины способны образовывать комплексы с ароматическими лекарственным молекулами, за счет этого повышается растворимость плохо растворимых гидрофобных лекарственных препаратов, снижается раздражающее действие на кишечник, циклодекстрин защищает лекарство от биодеградации в желудке, происходит пролонгированное постепенное высвобождение в кишечнике, защищает от мгновенного вымывания из кишечника за счет адгезивных свойств.

Свойства циклодекстринов:

- нетоксичные
- биодеградируемые
- эффективные комплексообразующие лиганды
- повышают биоактивность, растворимость и стабильность лекарственных веществ
- используются как система доставки
- уменьшают токсичность

Циклодекстрины могут включать в свои поры такие вещества, как моксифлоксацин. При образовании комплекса с молекулой лекарства КД-спектр циклодекстрина претерпевает сдвиг в более длинноволновую область, и тогда можно рассчитать константу связывания (аналитическое приложение). Также с помощью спектра КД можно проследить образование полимерной структуры из циклодекстринов.

Изучение вторичной структуры белков

Спектры КД зависят от:

- асимметрии окружения пептидных групп
- вторичной структуры и ароматических групп
- третичной структуры

Вторичная структура - укладка полипептидной цепи в регулярные структуры, поддерживается водородными связями между атомами полипептидной цепи. Боковые группы аминокислотных остатков в ее поддержании участия не принимают, но могут, напротив, дестабилизировать структуру, создавая неупорядоченные участки.

Какие существуют элементы вторичной структуры?

Альфа спирали. Стабилизирована водородными связями между аминогруппами и карбоксильными группам пептидной связи, направленными вдоль альфа-спирали, 3,6 остатков на виток. Какие виды альфа спиралей бывают в пептидах и какие именно в белках?

Если представить себе полипептид, пронумеровать его остатки с N до C конца, то можно выделить 2_7 (2 – какой по счету остаток, 7 – кол-во атомов углерода в цепи) спираль, 3_{10}, 4 $_{13}$, 5_{16}. В белках встречаются 3_{10} и 5_{16} спирали.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

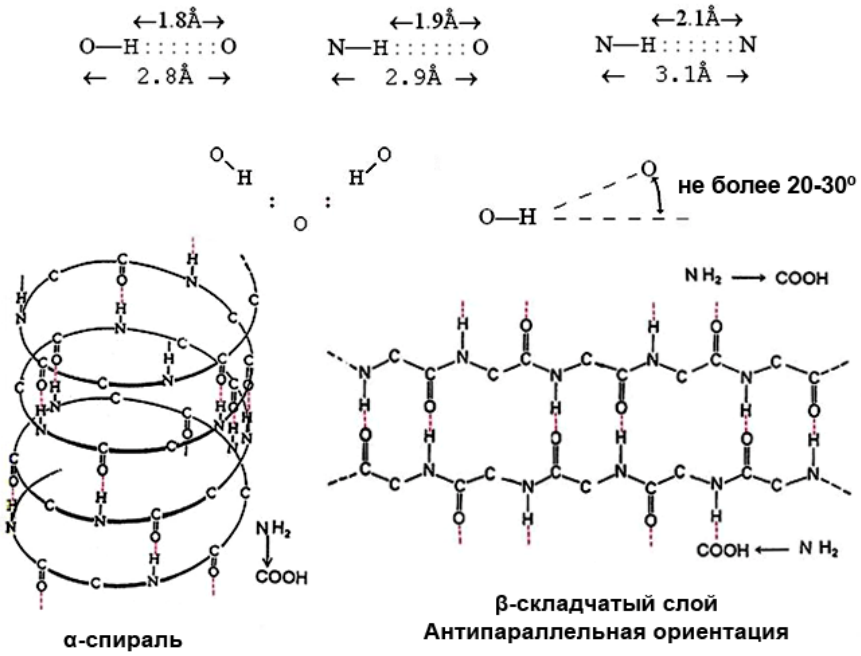


Рис.3.14 Водородные связи пептидных групп

Водородные связи боковых радикалов образуются между цистеином и серином, аспартатом и глутаматом, тирозином и глутамином, аспарагином.

Бета структуры образуются за множества водородных связей между атомами пептидных групп полипептидной цепи и представляют собой ассоциаты вытянутых зигзагообразных пептидных цепей.

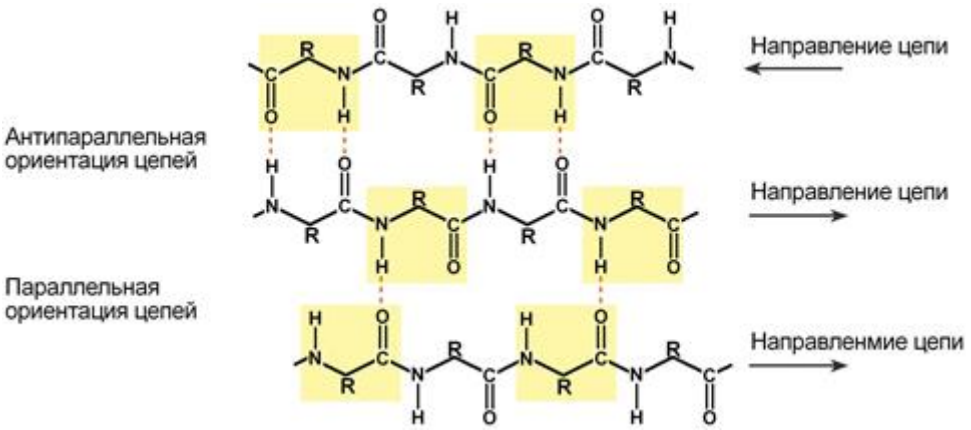


Рис. 3.15 Водородные связи в бета структурах

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

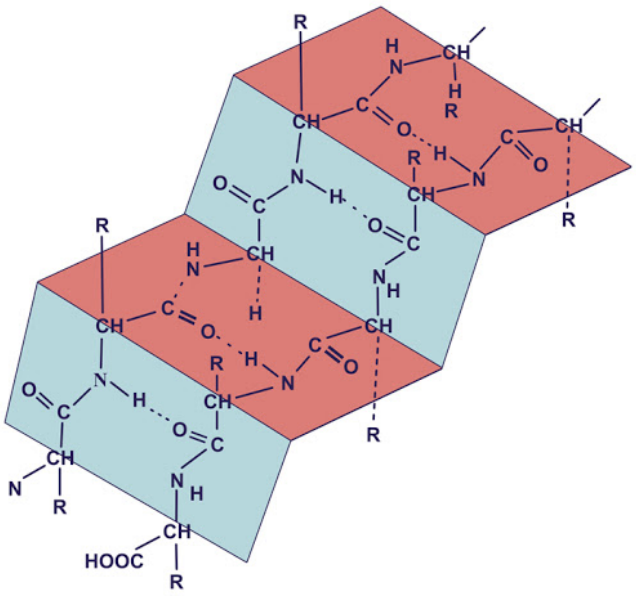


Рис. 3.16 «складчатость» бета структуры

Антипараллельные структуры в бета листах являются более прочными, т.к. не имеют углов в своих водородных связях. Такие структуры имеют важное значение в изучении агрегации белков (прионовых, при диабете и многих других), так как при агрегации образуются именно такие структуры. Края бета-структур соединяются бета-поворотами, состоящими из четырех аминокислотных остатков.

Также встречаются рандомные структуры.

Супервторичные структуры: например, структуры кератина шерсти и в-а-в-а-в структур. Образованы из нескольких спиралей или бета структур.

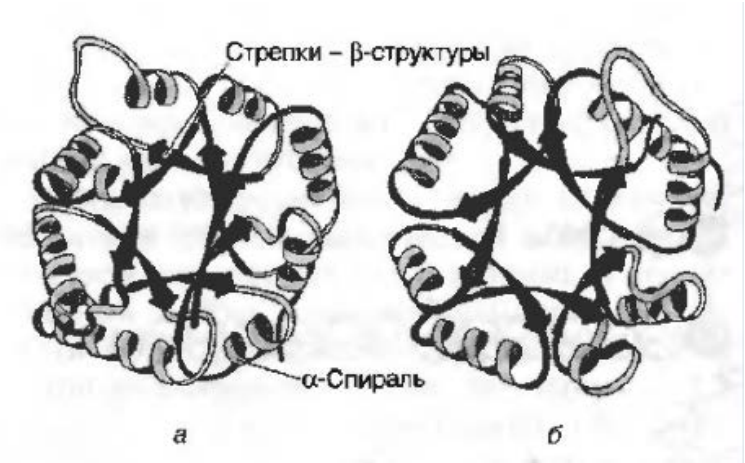


Рис. 3.17 Супервторичная структура типа «бочонок» триозофосфатизомеразы и пируваткиназы

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Четвертичная структура – расположение в пространстве взаимодействующих между собой субъединиц, образованных отдельными полипептидными цепями белка.

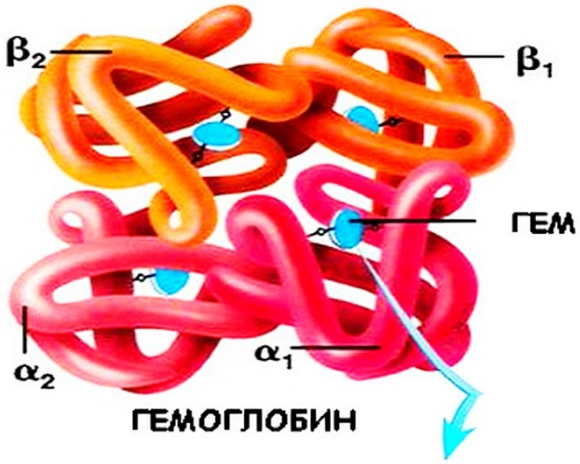


Рис. 3.18 Четвертичная структура гемоглобина, состоящая из 4х цепей

Исследование вторичной и третичной структуры белков с помощью КД спектроскопии.

Наиболее выраженный спектр имеют альфа спирали, на 208 и 222 нм два пика. Менее выраженными являются бета структуры, и наименее выраженные – рандомные структуры, например у пролин-богатых белков (рис. 3.19)

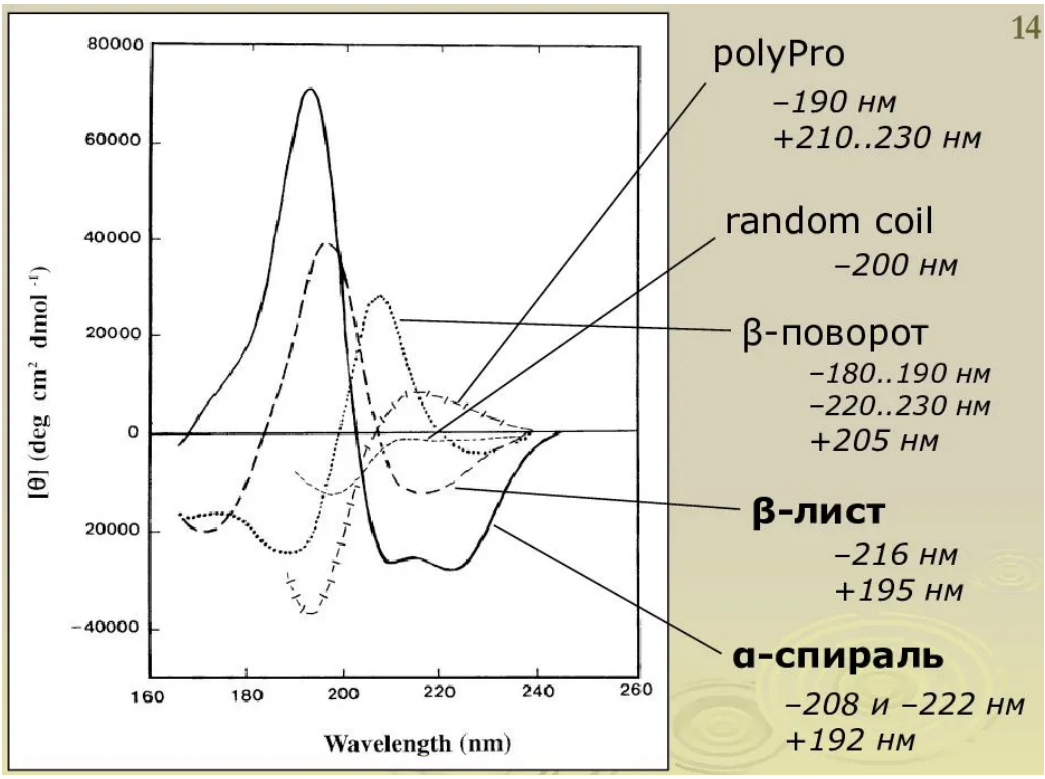


Рис. 3.19 КД-спектры вторичных структур белка

Выделяют два метода: записывание спектра в дальней области УФ (и наблюдение за вторичной структурой) и в ближней УФ области (и наблюдение за состоянием ароматических аминокислотных остатков – чем более они структурированы, тем более выражен спектр).

Лекция 4

Исследование вторичной и третичной структуры белка

Вспоминаем спектр КД различных структур:

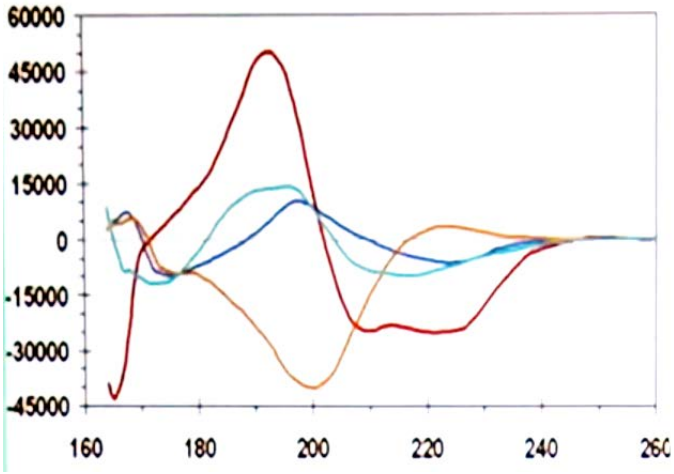


Рис. 4.1 Миоглобин (красная кривая), альфа спираль – конкавалин А (синяя), бета структуры – бета-лактоглобулин (голубая), коллаген – пролин богатый белок (оранжевый).

Теперь посмотрим приложения, относящиеся к методу спектроскопии кругового дихроизма, необходимые при определении свойств белков.

КД можно разделить, принципиально, на 2 метода.

1й метод: мы следим за вторичной структурой в дальней УФ области (180-260нм), где поглощают C=O группы пептидной.

- Вторичная структура (качественно и количественно)
- Агрегация (важно при изучении прионовых белков, белков болезней альцгеймера, паркинсона, диабета, онкологических заболеваний)
- Количественный анализ спектров (определение содержания белка, содержание пропорционально интенсивности аналитического сигнала)
- Процессы денатурации и сворачивания при воздействии различных факторов (эффекторов, ингибиторов, различных лигандов, при включении в мембраны и мицеллярные системы, липосомы

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

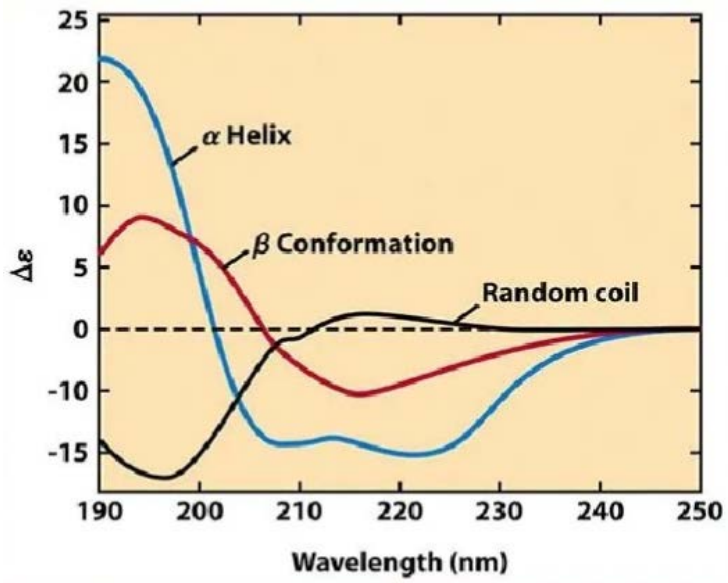


Рис. 4.2 КД спектры альфа спиралей, бета структур, рандомной структуры, в ближней УФ области

Чтобы видеть спектр в дальней УФ области, важны два фактора: оптическая активность и наличие хромофора.

2й метод: следим за третичной структурой в ближней УФ области (260-320нм), где поглощают аминокислотные остатки.

- Третичная структура
- Изменения микроокружения триптофана, тирозина

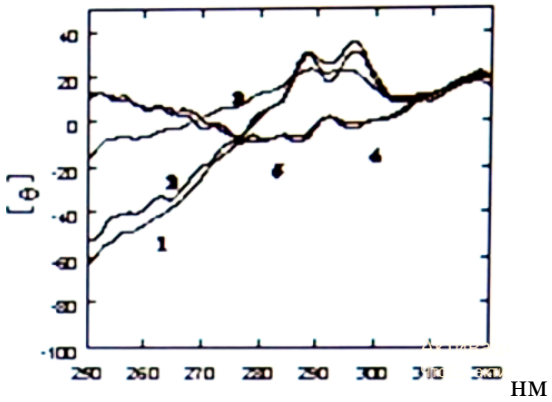


Рис. 4.3 КД спектр в ближней УФ области

Если белок хорошо свернут, то спектр хорошо структурирован, при денатурации наблюдается деструктуризация, снижение интенсивности КД спектра, показывающего, насколько триптофаны и тирозины вовлечены в регулярную структуру.

Теоретический спектр альфа спирали намного более интенсивный, т.к. альфа спираль существенно более регулярна и структурирована чем бета структуру и, тем более, чем

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

рандомные структуры.

На этом спектре (рис.4.4) интенсивность аналитического сигнала нормирована на аминокислотные остатки, т.е. коэффициент молярного поглощения альфа спирали в два-три раза выше, и, соответственно, он более чувствительный к изменению именно в альфа спирали.

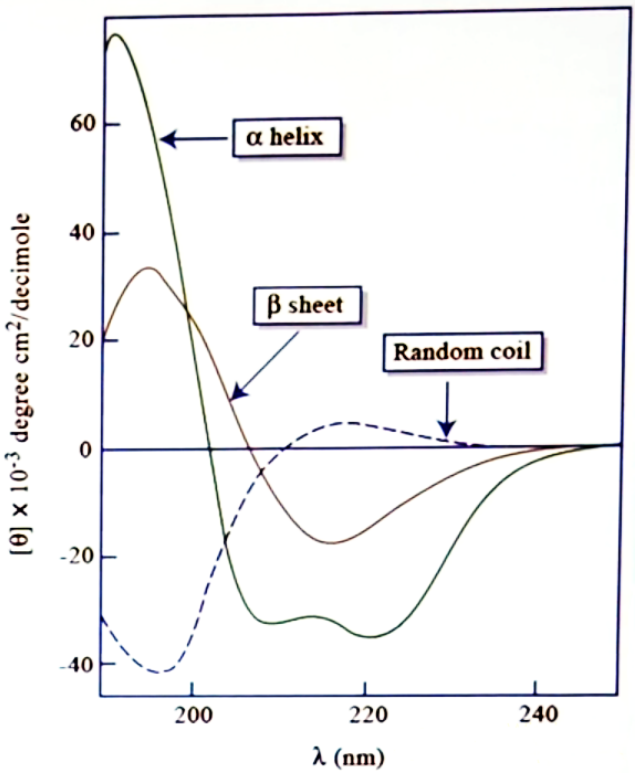


Рис. 4.4 КД спектры структур белка

Основные аналитически важные пики структур:
Альфа спираль: 222 (-) нм, 208 (-) нм, 192 (+) нм Бета листы: 216 (-) нм, 195 (+) нм, 175 (-) нм

Эмпирические формулы, позволяющие по интенсивности спектра КД определить содержание альфа спиралей:

$$fH=([\theta]_{208}-4{,}000)/(-33{,}000-4{,}000)$$

$$fH=([\theta]_{222}-3{,}000)/(-36{,}000-3{,}000)$$

Все это было примерное количественное исследование спектра. На самом деле при использовании метода КД стремятся к точному определению белков с использованием компьютерного моделирования.

Допустим, мы получили определенный спектр, который содержит несколько компонентов (рис. 4.5).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

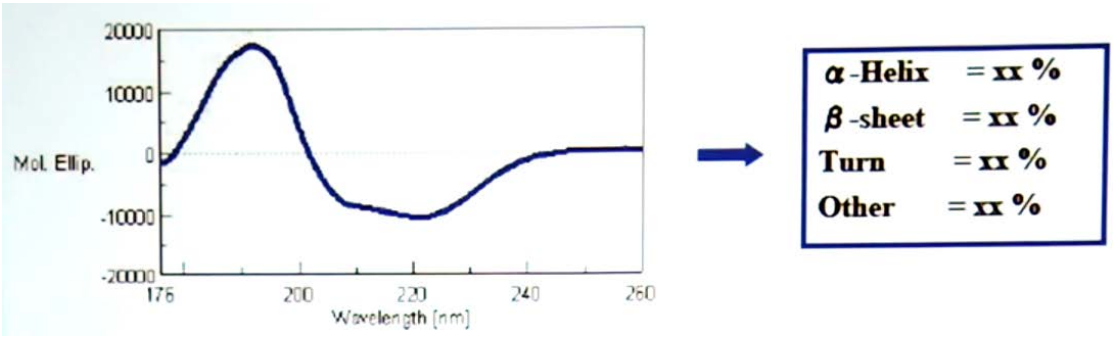


Рис. 4.5 Теоретический спектр КД белка

Математически, спектр — это зависимость молярной эллиптичности от длины волны для каждого их компонентов. Тогда возможно составить тензор:

$$\begin{bmatrix} \theta_{\lambda_1} \\ \theta_{\lambda_2} \\ \theta_{\lambda_3} \\ \vdots \\ \theta_{\lambda_{n-1}} \\ \theta_{\lambda_n} \end{bmatrix} \Rightarrow \begin{bmatrix} \alpha \\ \beta \\ T \\ O \end{bmatrix} \qquad \begin{bmatrix} \alpha \\ \beta \\ T \\ O \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \cdots & a_{1n-1} & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & \cdots & a_{2n-1} & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & \cdots & a_{3n-1} & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & \cdots & a_{4n-1} & a_{4n} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \theta_{\lambda_1} \\ \theta_{\lambda_2} \\ \theta_{\lambda_3} \\ \vdots \\ \theta_{\lambda_{n-1}} \\ \theta_{\lambda_n} \end{bmatrix}$$

Модельные спектры могут быть специально свернутыми полимерами (полилизин, полиаспарагиновая кислота), находящимися в конформации альфа спиралей, бета структур, рандомных структур. По модельным спектрам компьютерная программа оценивает и настраивает вклад отдельных структур в общий спектр так, чтобы создать спектр, максимально похожий на изучаемый.

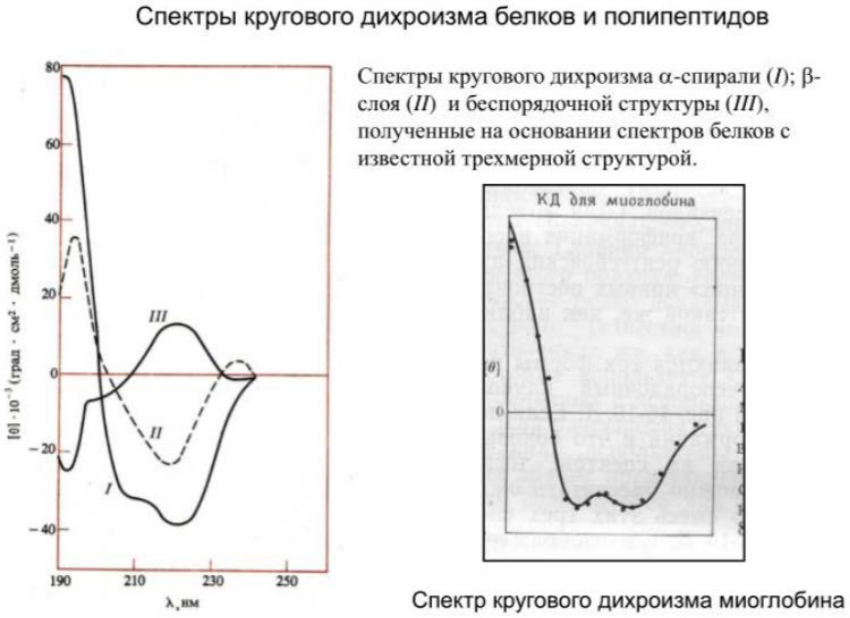


Рис. 4.6 Компьютерное моделирование КД спектра

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Денатурация

При помощи КД спектра можно следить за денатурацией белка (воздействие мочевины, поверхностно активных веществ, в водно-органических системах, при связывании с определенными эффекторами, при включении в системы доставки, протеолизе и т.д.).

По данному спектру (рис. 4.7) видно, что мы имеем дело с альфа богатым белком (белок, не подвергавшийся денатурации – линия «a»)

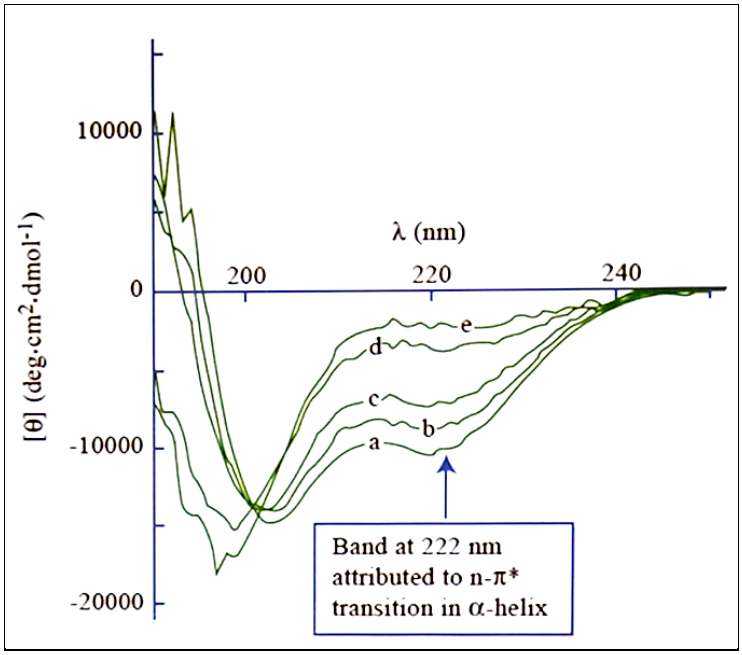


Рис. 4.7 КД спектр денатурации белка

При денатурации происходит последовательное снижение интенсивности на 222 нм, белок из альфа-богатого переходи в рандомную структуру.

Представим миоглобин в виде модельного белка, у которого внутри содержится гем (который важен для поддержания нативной структуры белка). Холобелок - полипротеин вместе с кофактором, апобелок - когда кофактор диссоциировал. При изменении условий, например, при сдвиге pH в кислую область (с 7,8 до 2,6), происходит денатурация белка, вследствие чего падает константа связывая с гемом, и тот диссоциирует. На КД спектре будет виден быстрый драматический переход из альфа богатой упорядоченной структуры в рандомную структуру.

Активность фермент-ПЭ комплексов в водно-спиртовых системах

Использование фермента важно в тонком органическом синтезе для получения редких веществ (редкие полисахариды, введение определенных заместителей, получение полусинтетических антибиотиков), которые невозможно получить в обычном химическом синтезе, при анализе пестицидов (пестициды экстрагируются с помощью органических растворителей, а значит, ферменты, использующиеся для их определения, также должны работать в водно-органических системах). Например, пероксидаза хрена используется в том числе в иммуноферментном анализе.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Ферменты, при добавлении в водно-органическую систему (напр. изопропанол) резко снижают свою каталитическую активность, и при 40% органического растворителя остается едва ли 5-10% активности фермента. Для нивелирования этого эффекта используются различные стабилизирующие добавки, и эту стабилизацию фермента видно на КД спектре.

Протеолитические ферменты используются также для целей синтеза. Протеазы катализируют как реакции синтеза, так и реакции протеолиза, и в водной среде равновесие сдвинуто в сторону гидролиза - образования пептидов и расщепления аминокислот, а в органическом растворителе равновесие сдвинуто в сторону синтеза, и, теоретически, для увеличения выхода продукта синтеза надо было бы увеличивать процент содержания органического растворителя. Однако мы видим, что в случае нативного фермента каталитическая активность снижается с увеличением содержания органического растворителя. Тогда, опять же, полимерные добавки позволяют стабилизировать фермент и позволяют иметь активный фермент при концентрации органического растворителя вплоть до 70-80%, что является довольно большим значением. Изменения стабилизации таких ферментов также отслеживаются с помощью КД спектроскопии.

КД в ближней УФ области

Также желательно следить за структурой - что происходит при различным модификациях - стабилизируется ли, дестабилизируется и тд. Как видно из КД спектра в ближней УФ области модифицированный глицеральдегидом химотрипсин при концентрациях, соответствующих линиям 3-5, претерпевает большие изменения конформации и потерю нативной структуры (например, в спектре исчезают пики, соответствующие вовлеченности триптофана и тирозина в плотно организованные структуры). Конечно, потеря вторичной структуры влечет за собой и потерю каталитической активности.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

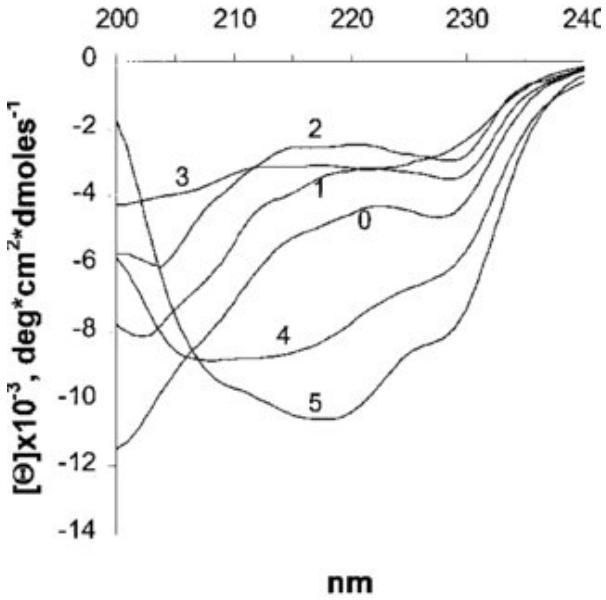


Рис. 4.8 КД спектр химотрипсина, модифицированного глицеральдегидом, в смеси вода-этанол различных концентраций (v/v): 0- 0%; 1- 20%; 2- 30%; 3- 40%; 4- 45%; 5- 50%.

При этом, что касается вторичной структуры химотрипсина:

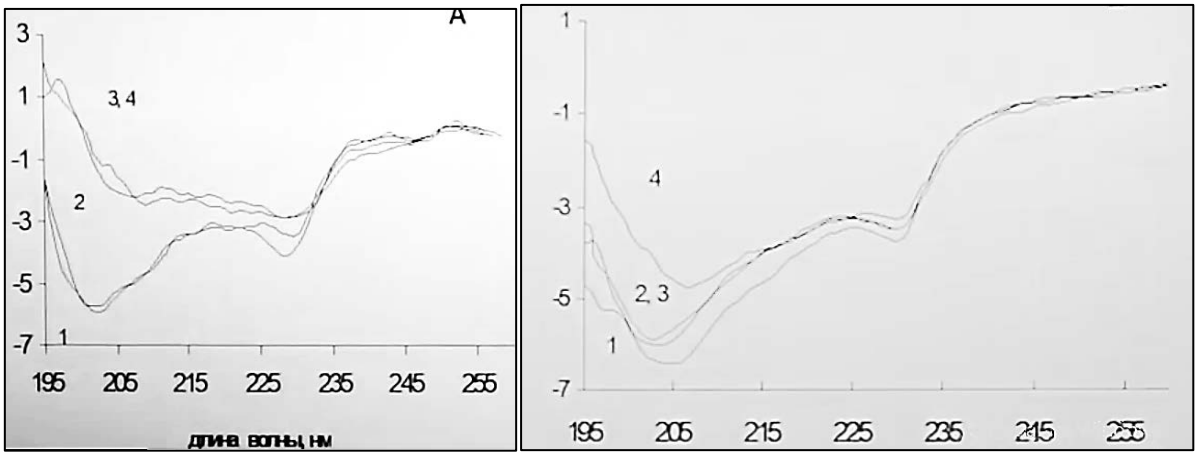


Рис. 4.9 КД спектр вторичной структуры химотрипсина (а) обычного химотрипсина (б) иммобилизованного.

КД спектр химотрипсина не очень выразительный, тем не менее, при добавлении высоких концентраций (более 30%) этанола мы видим существенные изменение на спектре – денатурация и приобретение рандомной структуры. У иммобилизованного (модифицированного) химотрипсина наблюдаются изменения вторичной структуры только при концентрациях этанола больших, чем 70%.

Таким образом, при помощи методов кругового дихроизма возможно следить за тем, как системы иммобилизации помогают стабилизировать белки для использования в различных, в т.ч. биологических целях (стиральных порошках, в тонком химическом синтезе и др. биотехнологических процессах).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Денатурация фермента при сверхвысоком давлении

Для чего необходимо изучать влияние сверхвысокого давления на белки? Как и температура, давление может быть регулятором, термодинамическим фактором, который может помочь повысить активность фермента в десятки раз. Во-вторых, под высоким давлением происходит стерилизация, т.е. очищение фермента. В-третьих, существуют реакции, которые не могут проходит в нормальных условиях атмосферного давления.

Термолизин – протеаза, выделенная из термофильных микроорганизмов, аналог карбоксипептидазы А. Он выдерживает до 300 МПа, небольшие изменения вторичной и чуть более значимые изменения третичной структур наблюдаются при 400 МПа.

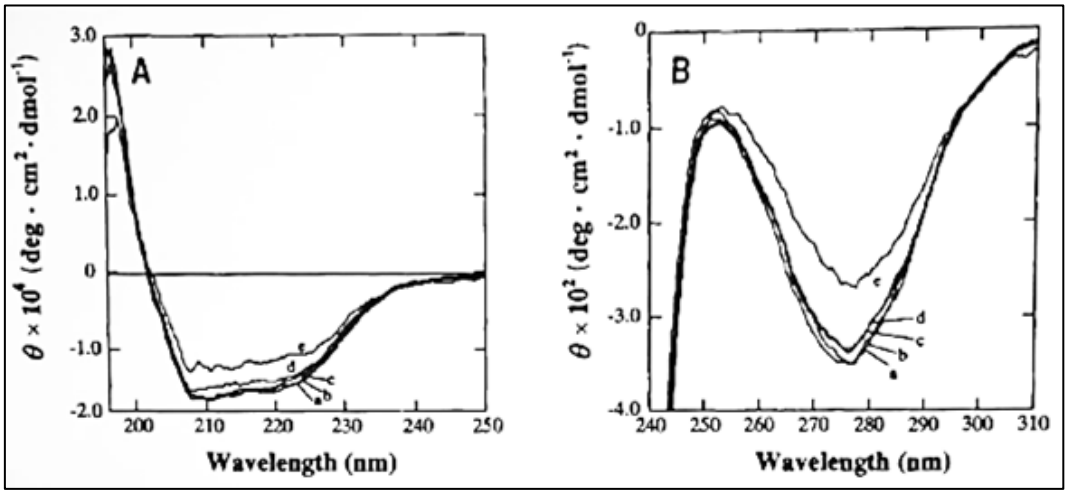


Рис. 4.10 Влияние давления на структуру термолизина (1 ч инкубации при 0,1, 100, 200, 300, 400 MPa). (а) – дальняя УФ область, отображает вторичную структуру, (б) – ближняя УФ область, отображает третичную структуру

Как это отображается на каталитической активности?

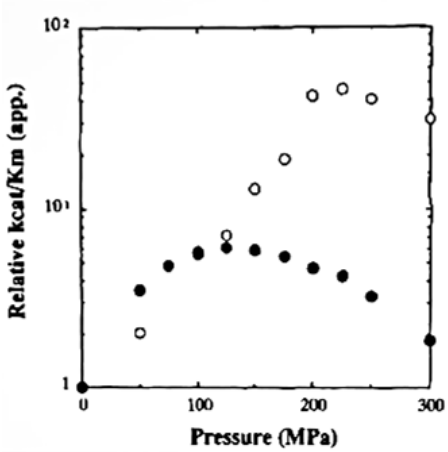


Рис. 4.11 Влияние давления на каталитическую активность. Белая кривая соответствует насыщению субстрата (субстрат стабилизирует фермент от денатурации), черная кривая соответствует условиях не-насыщения.

Применение КД для определения структурных изменений в белках при модификации

Овальбумин – мажорный белок куриного яйца. Он широко используется в пищевой промышленности в качестве поверхностно активного компонента, стабилизирующего пены и эмульсии (мороженое, коктейли, пенные творожки, зефиры и др пищевые продукты). Исследуются добавки, влияющие на его свойства, как поверхностно активного вещества.

На рисунке 4.12 изображены спектры овальбумина со следующими модификациями:
А – нативный альбумин
Б – S-овальбумин
С – сукцинилированный
D - гликолизированный
E - липофилизированный
F - метилированный

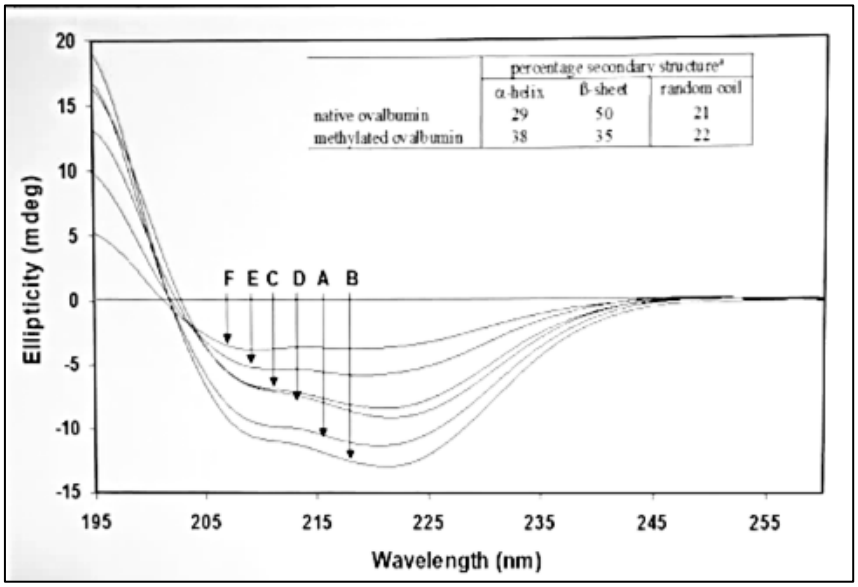


Рис. 4.12 Изменение интенсивности и формы КД спектра овальбумина при различных модификациях

Влияние связывания белков с лигандами на денатурацию

Определенный интерес вызывает исследование влияния связывания белков на термостабильность. Мы можем выбрать определенные ключевые длины волн (рис. 4.13) и построить термограмму как зависимость эллиптичности аналитического сигнала от температуры. Если мы в отсутствие кальция видим, что температура фазового полуперехода соответствует, скажем, 35 градусам (рис. 4.14 А), то в присутствии кальция, который является стабилизатором третичной структуры, температура фазового перехода будет составлять более 75 градусов. Аналогичная кривая получена для фермента, денатурированного с использованием мочевины.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

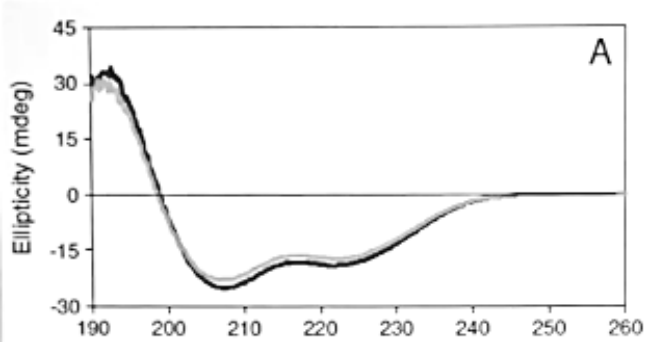


Рис. 4.13 КД спектр белка

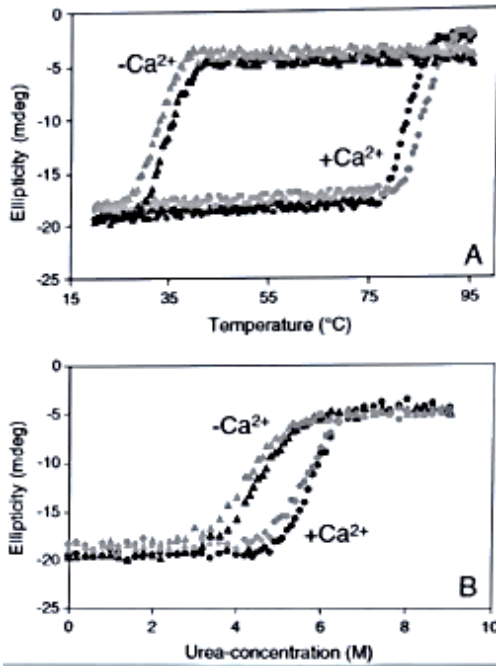


Рис. 4.14 Термограмма и денатурация под влиянием мочевины

Еще примеры использования КД методов в исследовании термостабильности белков: для третичной структуры: берем длину волны 280-290 нм и измеряем зависимость эллиптичности от температуры (термограмма). Возможно посчитать константу фазового перехода и температуру полуперехода, рассмотреть влияние модификаций на устойчивость.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

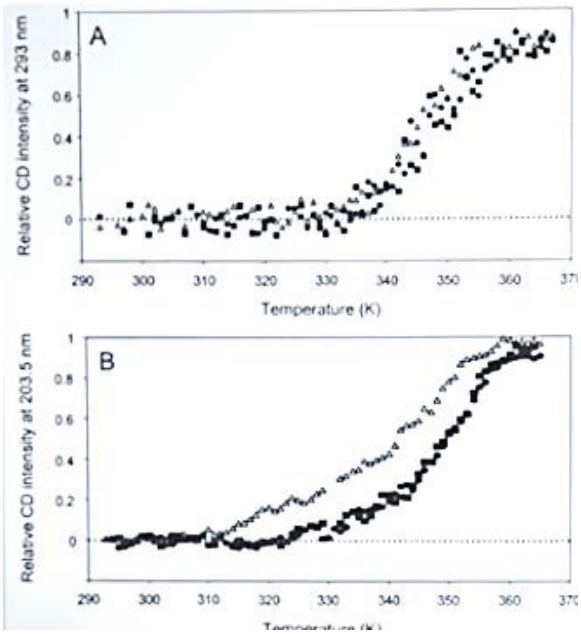


Рис. 4.15 Кривые термоденатурации лактоглобулина (нативного и модифицированного углеводами) А – в ближней УФ области по третичной структуре, В – в дальней УФ области по вторичной структуре

Для определения свободной энергии стабилизации белка тоже используют зависимость аналитического сигнала (эллиптичность) от температуры или содержания денатурирующих агентов (гуанидин и т.д.). Данная термограмма (рис. 4.16) соответствует переходу с полностью нативной конформации в полностью денатурированную. Дельта G данного процесса и является свободной энергией стабилизации белка, выражается в kJ/mol.

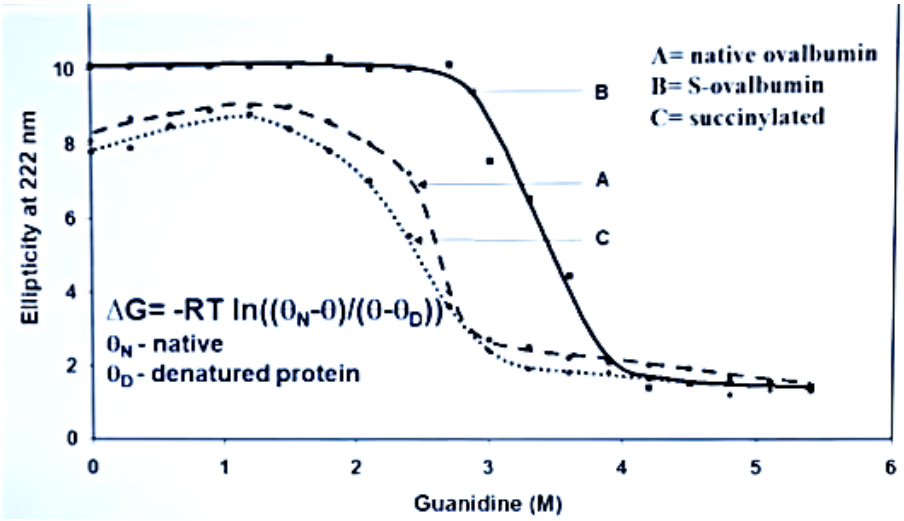


Рис. 4.16 Кривые денатурации овальбумина

Слежение за агрегацией белка методом КД

Важной возможностью является слежение за агрегацией белков по образованию межмолекулярных антипараллельных бета-структур. Хотя обычно бета структуры вносят небольшой вклад в КД спектр, при именно межмолекулярных взаимодействиях наблюдается драматическое изменение содержание бета структур (на 200-500%). На данном спектре (рис. 4.17) виден значительный рост пика, что соответствует образованию все еще растворимых агрегатов (линии 3-6).

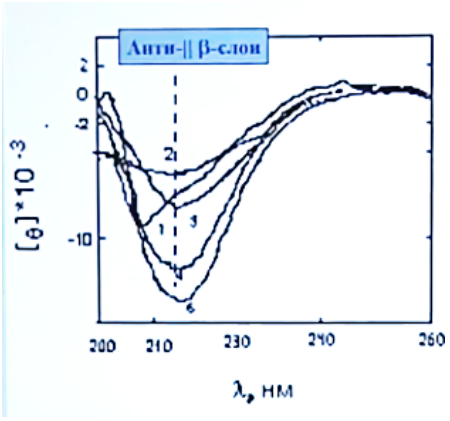


Рис. 4.17 КД спектр химотрипсина, модифицированного глицеральдегидом в смеси вода-этанол

Амилоидозы

Процессы агрегации белков наблюдаются при образовании амилоидных структур. Амилоидозы – это заболевания, вызванные белковыми внеклеточными образованиями фибрилл.

Амилоиды – это неразветвленные белковые фибриллы, которые содержат регулярно повторенные бета-цепи, перпендикулярные оси фибриллы, и формирующие кросс-бета-слои. Протофиламента соединяются между собой вдоль латеральной оси. Филаменты, в свою очередь, взаимодействуя между собой, образуют фибриллу. В медицине амилоиды определяют как белковые внеклеточные фибриллы, связывающие специфические красители и вызывающие амилоидозы.

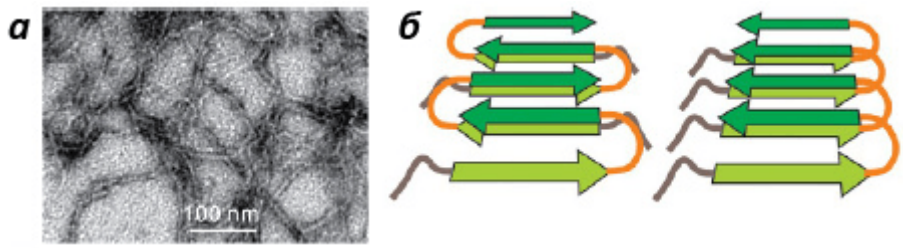


Рис. 4.18 (а) Микроскопия ткани с амилоидозом (б) схема строение амилоида

Понимание образования амилоидных структур и его условий важно при изучении таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, диабет, прионовые болезни.

Отличия амилоидных полимеров от других форм белковой агрегации:

- Структурированность и прочность амилоидных агрегатов настолько высока, что они не распадаются при инкубации с высокими концентрациями детергентов (такими как ДСН). Так, например, тельца включения, получающиеся при синтезе рекомбинантных белков, легко распадаются при воздействии детергентов
- Амилоиды связываются с красителем – конго красным. Этот краситель используется для обнаружения амилоидозов в тканях
- Амилоиды способны к самовоспроизведению: при взаимодействии с мономерами амилоидогенного белка нормальной растворимой конформации они автокатализируют для них процесс укладки амилоидной формы
- Полимеризация белка в амилоидную структуры происходит без участия молекул АТФ. Поэтому амилоидные фибриллы могут собираться самопроизвольно, как в клетке, так и in vitro

Образование амилоидных структур белка бета, ответственного за развитие болезни Альцгеймера:

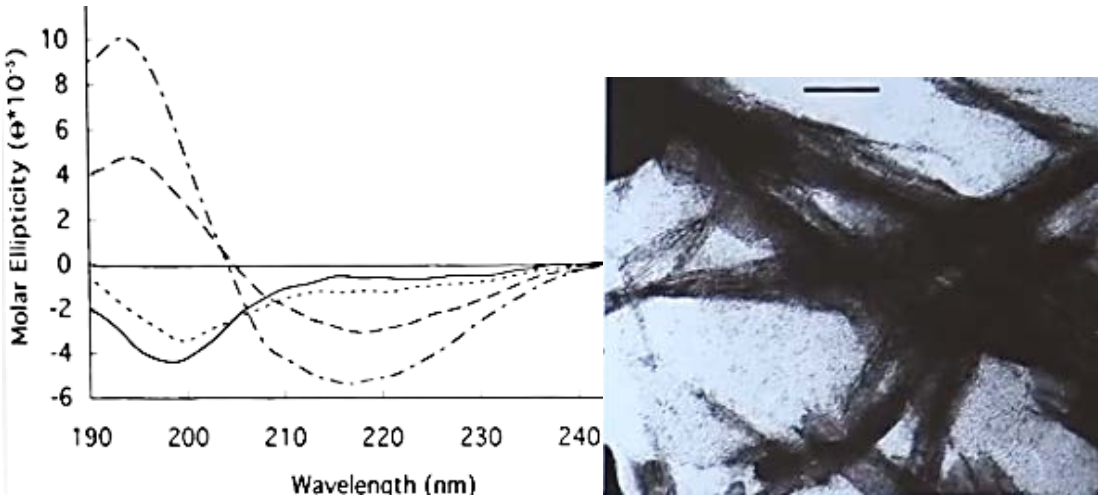


Рис. 4.19 (а) – КД спектр агрегации NAC-(1-18)-пептида (б) – электронная микроскопия фибрилл

При диабете в присутствии углеводов наблюдается денатурации и агрегация глюкозооксидазы (рис. 4.20). (линия 6 на рис 4.20a соответствует образованию антипараллельных бета-структур, на рис. 4.20c видно преобразование третичной структуры в ближней УФ области)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

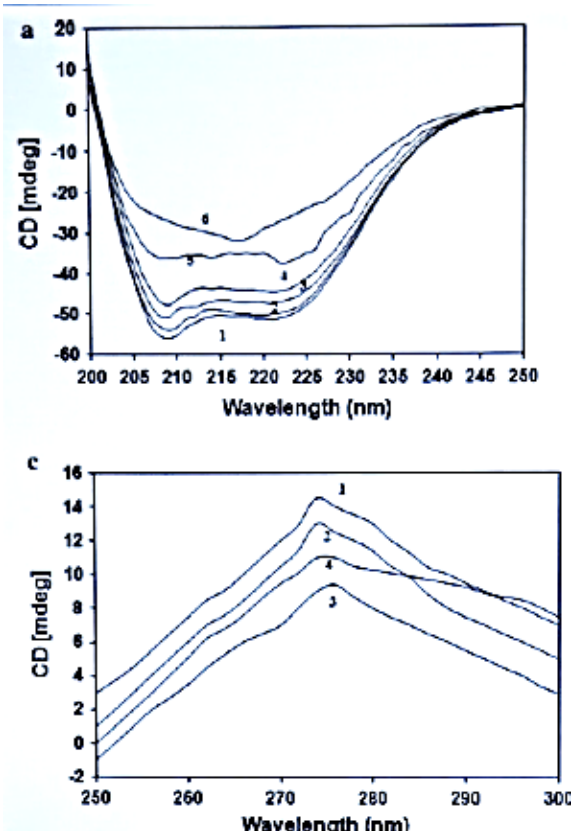


Рис. 4.20 Денатурация глюкозооксидазы в дальнем и ближнем УФ спектрах.

Также при диабете изменениям подвергается гемоглобин. В присутствии глиоксаля (это модельный индуктор углевод) ключевым образом меняется спектр: снижается структурированность спектра за счет уменьшения содержания альфа-спиралей, происходит денатурация и дальнейшая агрегация (линии от 1 к 4)

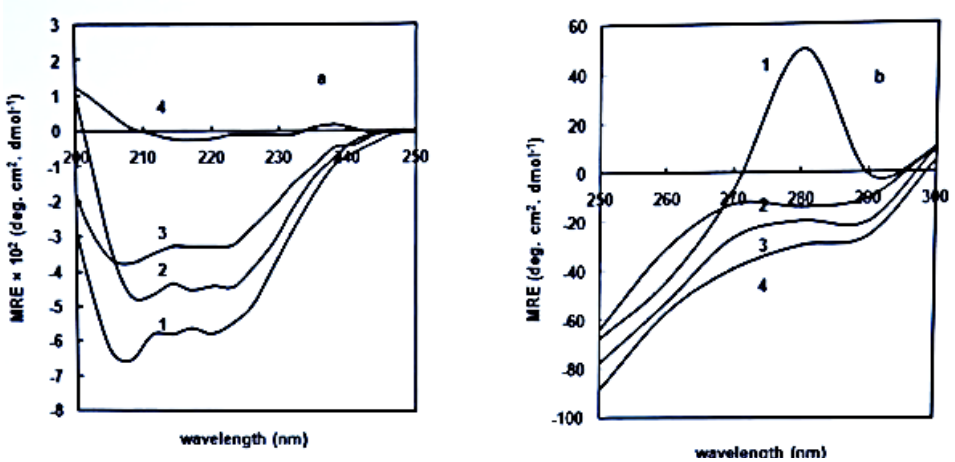


Рис. 4.21 Спектры денатурации гемоглобина в дальней (a) и ближней (b) УФ областях

Роль амилоидных белков иногда связана не только с накоплением токсичных агрегатов и бляшек, но и с нарушением функционирования других белков. Пример: белок p53 –

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

анти-онкоген, отвечает за апоптоз при ДНК повреждениях. Формирование амилоидоподобных агрегатов мутантного p53, которые интерферируют с нативной формой белка, может приводить к развитию раковых опухолей.

Сравнение свойств нативной и мутированной форм белка p53 (нативная форма устойчива к различным факторам, в то время как мутантная форма образует агрегаты). На КД спектрах появляются большие пики на 216-218 нм, соответствующие антипараллельным межмолекулярным бета структурам.

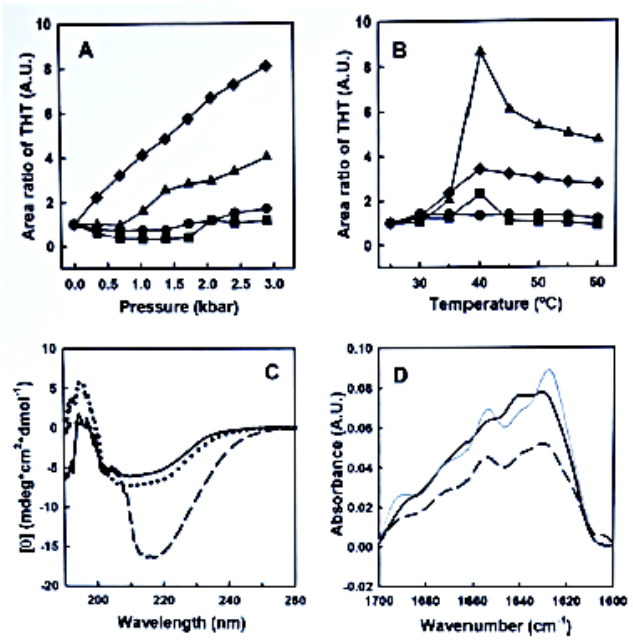


Рис. 4.22 Сравнение свойств нативной и мутированной форм белка p53. КД (A-C) и ИК (D) спектры.

Применение мицеллярного подхода при ренатурации белков

Интересным приложением также является слежение за сворачиванием, фолдингом белка в режиме настоящего времени по спектру КД, когда происходит образование вторичной структуры.

При получении рекомбинантных белков могут получаться тельца включения – агрегированные аморфные белки, неправильно свернутые и не имеющие, соответственно, каталитических свойств. Однако в таких агрегатах содержание целевого белка составляет порядка 95-98%, значит, практически не нужна очистка, и проблема только в отсутствии правильной конформации.

Существует метод использования системы обращенных мицелл для защиты белка от агрегации в процессе сворачивания. Как это происходит: у нас есть тельца включения, и теперь надо провести фолдинг, активирование белка. Для этого добавляют гаунидинхлорид, смесь глутатионов для восстановления неправильных дисульфидных мостиков, добавляется кофактор, инициирующий самопроизвольный процесс сворачивания белков примерно в течение 1 часа. За 1 час молекулы белка могут снова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

неправильно агрегировать, и, чтобы исключить этот процесс, используется мицеллярная система (система обращенных мицелл на границе раздела фаз вода-органический растворитель). При увеличении содержания воды вплоть до 2% происходит увеличение внутренних полостей мицелл. При увеличении содержания поверхностно активного вещества происходит увеличение количества мицелл. Такие системы позволяют солюбилизировать белки с сохранением их каталитической активность, предотвращая агрегацию.

Применение системы обращенных мицелл ПАВ позволяет:

- Формировать желаемую надмолекулярную форму белка
- Проводить диссоциацию комплексов
- Проводить ассоциацию молекул белка

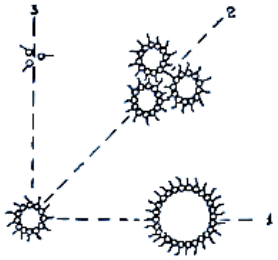


Рис. 4.23 Образование системы обращенных мицелл

Солюбилизация белков в мицеллярной системе позволяет определять структуру фермента во времени (рис. 4.25) и изменение каталитической активности с учетом олигомеризации (рис. 4.24).

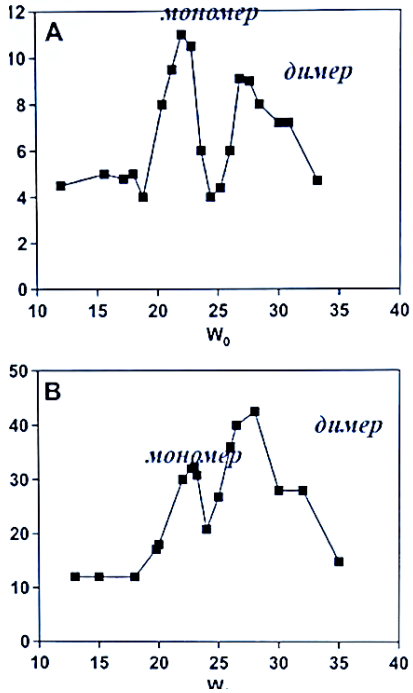


Рис. 4.24 Активность фермента

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

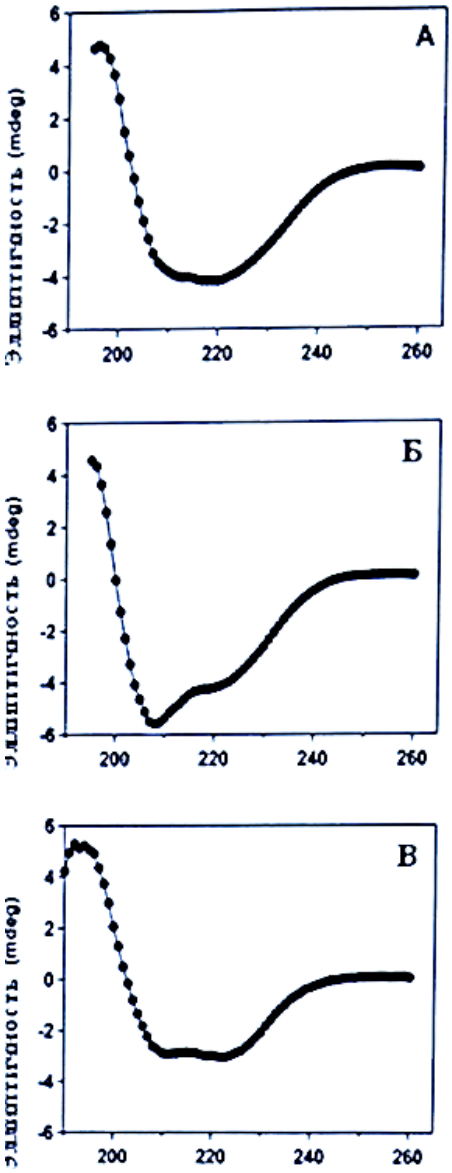


Рис. 4.25 Развитие структурированности фермента

Если фермент имеет четвертичную структуру, то его активность будет зависеть в т.ч. от гидратации, размеров внутренних полостей.

Инфракрасная спектроскопия.

Применение ИК-спектроскопии:

- в аналитической химии - позволяет проводить качественный и количественный анализ образцов (сколько, какие группы присутствуют, в каких положениях заместители)
- в физике - исследование энергетических уровней и межатомных расстояний в молекулах (моделирование расчётных спектров, сравнение с экспериментальными)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

- в органической химии - беспрецедентно важный аналитически значимый метод, идентификация органических соединений и функциональных групп, доступность анализа во всех состояниях - твёрдом, жидком, газообразном
- в биохимии - крайней информативный метод исследования структуры биомолекул и механизмов биопроцессов
- в физической химии - исследование кинетики и механизмов каталитических реакций в гомогенных и гетерогенных системах

Возможности ИК спектроскопии

- анализ жидких, твердых, газообразных образцов как в гомогенных, так и в гетерогенных системах: плёнках, суспензиях, гелях, пенах, т.к. метод не требует оптической прозрачности
- метод может быть использован для анализа тонкой структуры молекул в исходном состоянии и при взаимодействии с различным микроокружением, например при включении в системы доставки лекарств.
- широкий спектр исследуемых процессов: агрегация, включение в системы доставки, образование водородных связей, протонирование-депротонирование, взаимодействия с эффекторами. В целом получаемая информация очень многогранна: качественный и количественный анализ; структура молекул; микроокружение функциональных групп; информация о молекулярной динамике (подвижности); кинетика и механизмы каталитических реакций; получение термограмм
- в спектре присутствуют аналитически значимые области, в т.ч. - “отпечатки пальцев” - представляющие собой набор пиков, который характерен только для конкретного соединения, причем не всегда понятно, к каким именно структурным компонентам молекул относятся эти пики. Существуют пики, которые выражены для определенных функциональных групп, а есть те, которые с трудом поддаются интерпретации.

ИК-область

ИК область (от латинского infra – ниже красного) разделяется на три диапазона:

- Ближний – высокочастотные колебания
- Средний – здесь расположены колебательные спектры валентных связей, именно этот интервал является аналитически значимым в биохимии
- Дальний – вращательные спектры

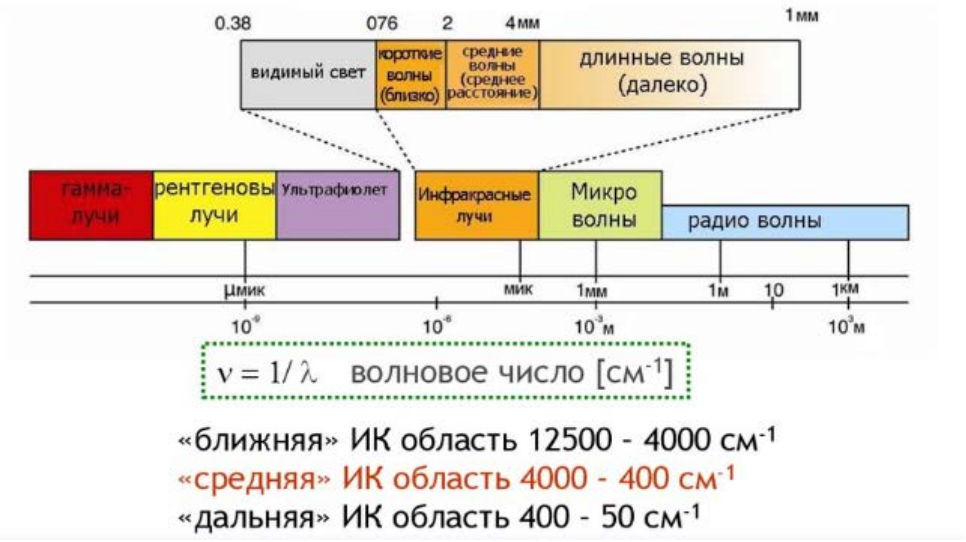


Рис. 4.26 Виды электромагнитного излучения

Полная энергия молекулы поступает на вращательно колебательные электроны. В случае ИК спектра мы следим за колебательными уровнями.

$$E = E_{пост} + E_{вр} + E_{кол} + E_{эл}$$

Постулат Бора: энергия атомов и молекул квантована.

Следствие: переходы между энергетическими уровнями сопровождаются поглощением строго определенных порций энергии.

Соответственно, в ИК диапазоне молекулы поглощают излучение тех частот, которые соответствуют переходам между колебательными энергетическими подуровнями.

$$\Delta E = h\nu$$

Основы спектроскопии: в спектрах молекул наблюдаются характеристические полосы поглощения.

Преимущества ИК-спектроскопии Фурье

- Высокая информативность (количественный и качественный анализ, структура, динамика)
- В ИК диапазоне светорассеяние не вносит вклад в спектр (можно изучать гетерогенные системы)
- Не требуется оптическая прозрачность образцов (изучение твердых, жидких, газообразных систем)
- Экспресс метод – изучение быстрых процессов (изменение конформации, каталитическая активность ферментов)

Виды ИК-спектроскопии

1. Режим пропускания/поглощения (абсорбции)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

В прозрачную в ИК кювету помещается образец, пропускается луч, измеряется соотношение прошедшего света к падающему, ИК спектр поглощения рассчитывается по формуле

$$Abs = -\log(I/I_0)$$

2. Метод нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, ATR)
На германиевый кристалл наносятся раствор, пленка или суспензия белка. В отсутствие образца свет падает под таким углом, что происходит полное внутреннее отражение. При нанесении образца, который поглощает и преломляет свет, происходит только нарушенное полное внутреннее отражение. В этом случае спектр рассчитывается по формуле:

$$Abs = -\log(R/R_0), \quad \text{где R – отражение}$$

3. Режим внешнего отражения

Например, используется внешнее отражение с поверхности раздела фаз вода-воздух. Для этого используется ленгмюровская пленка, образец наносится и адсорбируется на поверхности раздела фаз, измеряется спектр внешнего отражения. В зависимости от состава системы можно вычислить следующую информацию: концентрация, конформация, пространственная ориентация на разделе фаз. При использовании барьеров возможно сжать белковую пленку и определить зависимость каталитической активности от доступной поверхности (на поверхности меняется конформация и пространственная ориентация молекул).

На границах поверхности вода-воздух и вода-масло происходит спонтанная адсорбция молекул белка в несколько стадий, которые анализируются методом внешнего отражения:

1) транспорт молекул белка в поверхности – диффузия
2) взаимодействие белка с поверхностью
3) конформационные изменения
4) взаимодействия между соседними молекулами белка, образование мультислоев
5) отклик на приложенное воздействие на пленку (растяжение-сжатие, десорбция/гелеобразование)
6) разрушение слоя

ИК-микроскопия

- Позволяет исследовать послойно био-объекты, полмеры, микрочастицы, ленгмюровские монослои
- Пространственное разрешение: 1-2 микрон
- Режимы: пропускания и отражения
- Для неотражающих и непрозрачных объектов есть режим НПВО
- Высокая чувствительность

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Виды колебаний

Валентные колебания – ритмические колебания вдоль оси связи, при которых расстояние между колеблющимися атомами увеличивается или уменьшается, сами атомы остаются на оси валентной связи. Частота асимметричного колебания выше, чем симметричного.

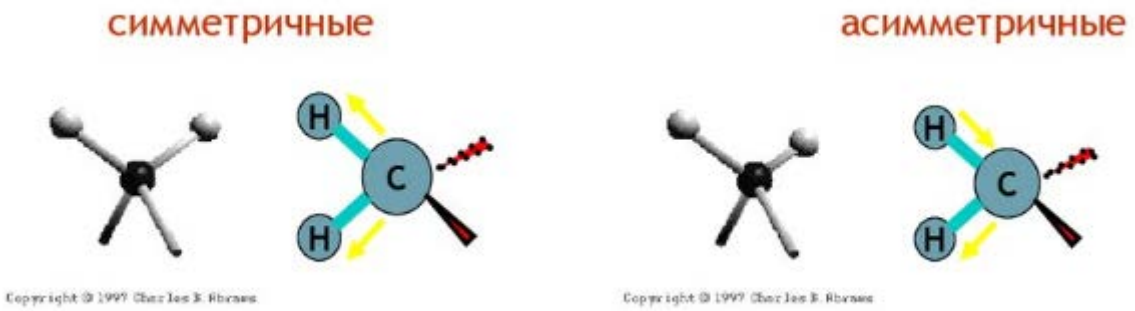


Рис. 4.27 Валентные колебания

Деформационные – колебательные движения ядер, приводящие к изменению углов между связями.

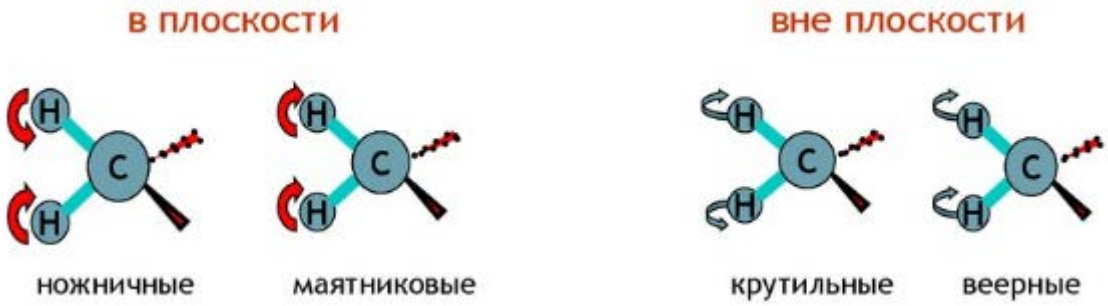


Рис. 4.28 Деформационные колебания

Так, например, на ИК спектре воды (рис. 4.29) явно видны валентные (асимметричные и симметричные) и деформационные ножничные колебания.

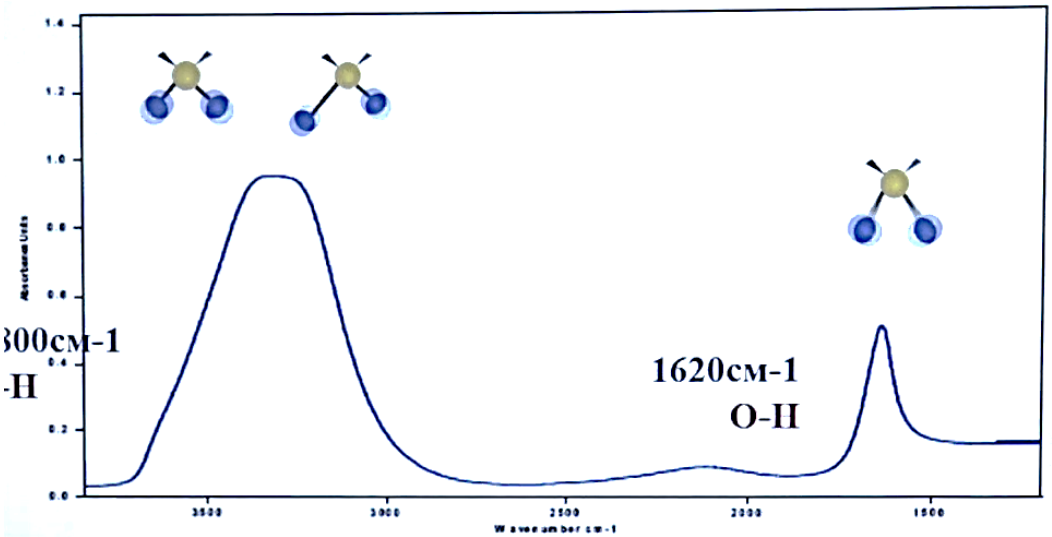


Рис. 4.29 ИК спектр молекулы воды

В ИК спектроскопии спектр это зависимость интенсивности поглощения не от длины волны, а от частоты.

Закон Гука

$$\nu = \frac{1}{2\pi c}\sqrt{\frac{K}{\mu}}$$

ν – частота колебаний
c – скорость света
K – силовая постоянная связи
μ – приведенная масса связи $\mu = \frac{M_1 + M_2}{M_1 M_2}$

Какую информацию можно получить из ИК-спектра?

- Из характеристического спектра можно узнать группы соединений (функциональные группы) – на этом основан качественный анализ
- Интенсивность полос поглощения пропорциональна концентрации вещества – количественный анализ
- Анализ характеристических частот колебаний связей (положение и их форма) дают информацию о структуре и микроокружении молекулы

ИК спектроскопия позволяет проводить анализ в реальном времени, так можно следить за процессами сворачивания белка, агрегации, изменений конформации, взаимодействия с лигандами и др.

Чего не может ИК - спектрофотометрия:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

- Проводить качественный анализ
- Проводить локальный анализ и анализ поверхности
- Проводить анализ объектов сложного состава
- Проводить анализ без пробоподготовки

Единицы измерения

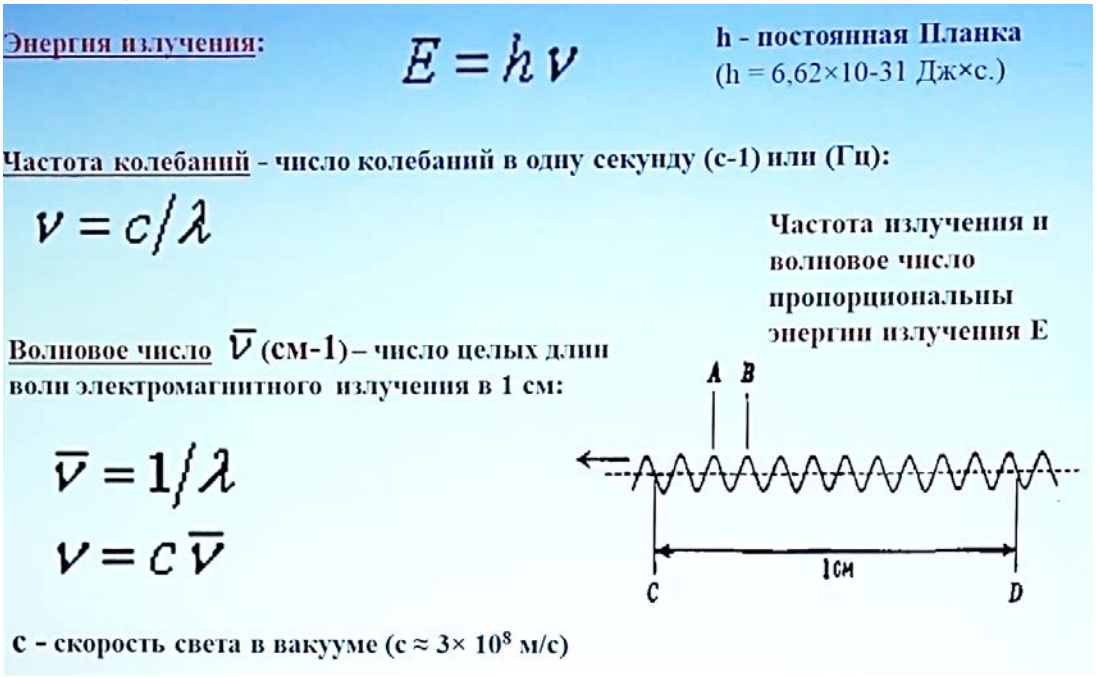


Рис. 4.30 Единицы измерения ИК спектроскопии

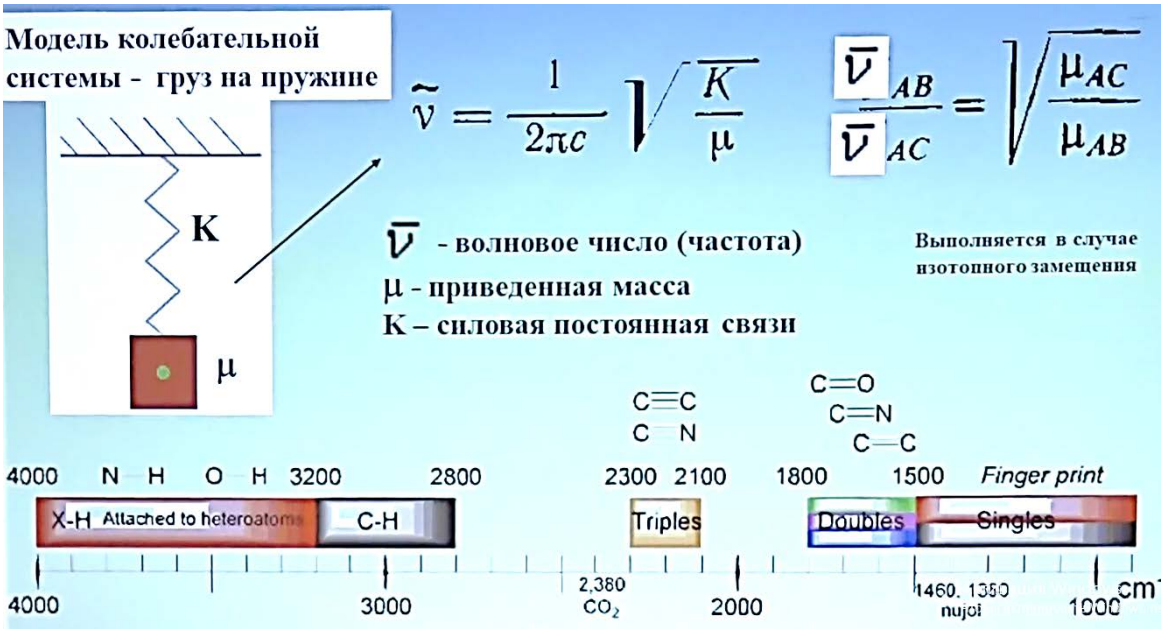


Рис. 4.31 Влияние атомной массы на частоту колебаний молекулы

Факторы, влияющие на частоты колебаний функциональных групп

- Изменение атомной массы
- Электронные эффекты
- Резонанс (сопряжение связей)
- Водородная связь
- Агрегация молекул
- Напряжение углов и связей
- Агрегатное состояние вещества
- Растворитель, микроокружение

Силовая постоянная (k, коррелирует с энергией связи) прямо пропорциональна порядку связи и обратно пропорциональна длине связи.

Вид связи	E св. кДж/моль	ν, см $^{-1}$
C-C	350	1000
C=C	620	1600
C≡C	816	2200

Прочность связи уменьшается, уменьшаются частота и энергия связи с возрастанием ее длины.

Электронные эффекты

Самый известный – индуктивный. Карбонильная группа имеет выраженный аналитически значимый пик на 1620 см-1 – это хорошая модельная группа. Если заместителем будет хлор, то длина двойной связи составит 1800 см-1, если донором электронов будет CH3, то длина связи составить 1715 см-1 (связь становится практически одинарной).

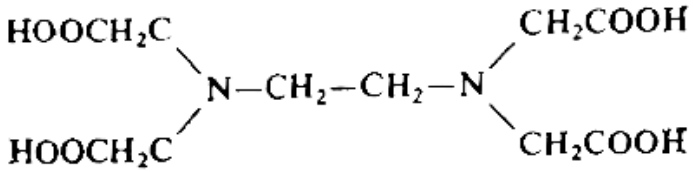
Эффект резонанса – сопряжение кратных связей стабилизирует структуру, понижает частоту колебания группы C=O на 30-40 см-1 и повышает интенсивность валентного колебания.

Влияние ионизации COOH группы на частоту поглощения. Хорошим примером является титрование лимонной кислоты. Если кислота протонирована, то поглощение наблюдается при 1715 см-1, карбонильная связь двойная, при депротонированаии наблюдается делокализация заряда, эффект разонанса частота поглощения резко падает до 1580 см-1.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Влияние комплексообразования на частоты колебаний функциональных групп

Пример: комплексы ЭДТА:



Эффекты ионизации и координации СООН-группы в ЭДТА:

1) **Свободная СООН-группа: 1750-1700 см-1**
2) **Свободная СОО— группа: 1630-1575 см-1**
3) **При образовании комплексов с металлами частоты валентных колебаний СОО— группы** увеличиваются до **1650-1620см-1:**

(эффект обратный диссоциации)
– можно следить за комплексообразованием;

Влияние геометрии молекулы на частоты колебаний

Интенсивность полосы поглощения в ИК области определяется изменением дипольного момента в процессе колебания.
1) Цис-транс изомерия: валентное колебание C=C связи не проявляется в случае CH2=CH2, транс изомеров, т.к. колебание проходит около центра симметрии и не вызывает изменения дипольного момента.
2) Влияние стертических факторов: C=C связь наиболее устойчива в структуре в форме квадрата, с таких фигурах, как шестиугольник, пятиугольник, треугольник колебания C=C связи заморожены, повышается силовая постоянна k, частота увеличивается.

Ряд функциональных групп (-CH3, -C=O, -PO2, -C=C, -C=N) имеют постоянный характеристический интервал частот поглощения в ИК области, что имеет значения для идентификации веществ.

Валентные колебания связей:

1) X-H: 4000-2800 см-1
2) тройные: 2500-2000 см-1
3) двойные: 2000-1500 см-1
4) одинарные: 1300-600 см-1

Основные связи и их области поглощения:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Связь	Область поглощения, $см^{-1}$
C – C C – O C – N	800 – 1300
C=C C=O C=N N=O	1500 – 1900
C≡C C≡N	2000 – 2300
C – H N – H O – H	2700 – 3800

Область поглощения двойных связей важна при изучении белков и пептидов (амидные связи пептидной цепи, отвечающие за упаковку в альфа спирали и т.д.)

Пример расчетного спектра

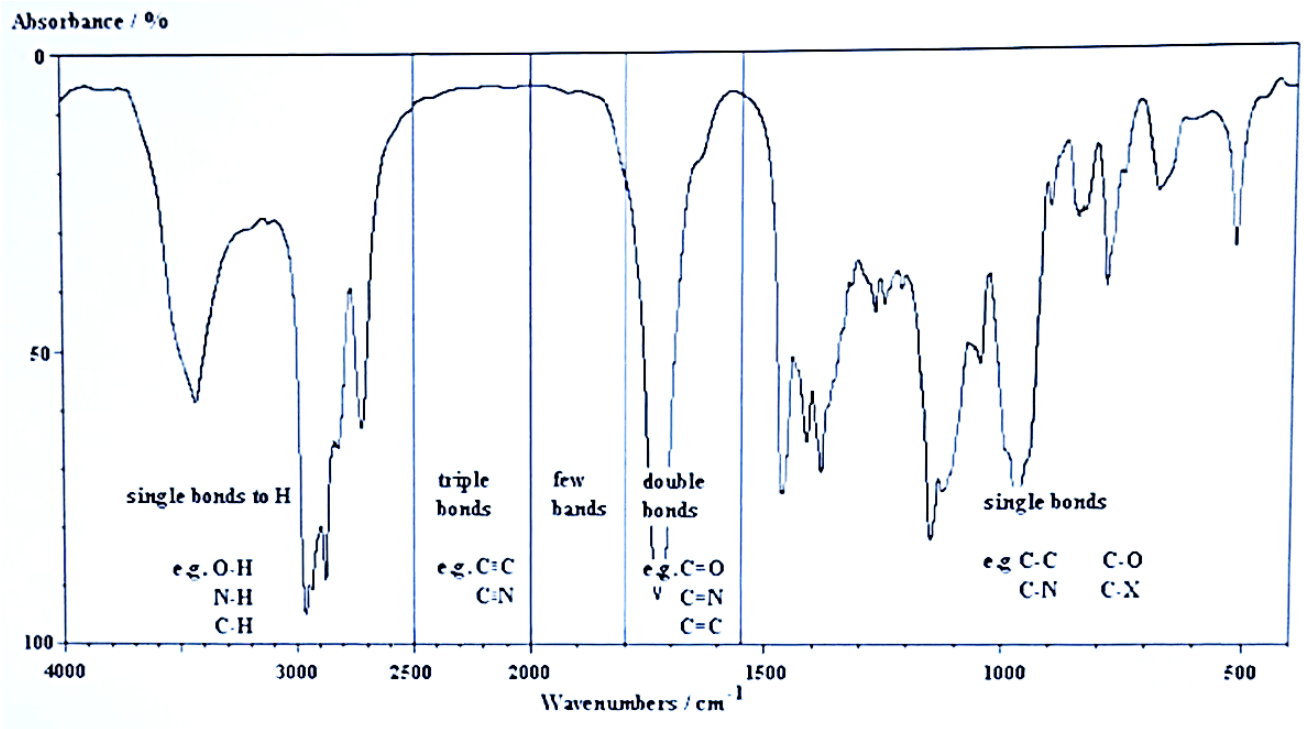


Рис. 4.32 Пример расчетного спектра

Лекция 5

Напомним, что с увеличением энергии излучения в ИК области наблюдается ряд характеристических полос поглощения, и мы выделяем несколько зон поглощения.

Связь	Область поглощения, $см^{-1}$
C – C C – O C – N	800 – 1300
C=C C=O C=N N=O	1500 – 1900
C≡C C≡N	2000 – 2300
C – H N – H O – H	2700 – 3800

Рис. 5.1 Основные зоны поглощения в ИК области

Область 1300-600 см-1 включает в себя, помимо области поглощения валентных колебаний одинарных связей, и область деформационных колебаний различного происхождения (маятниковые, веерные и т.д.). В этой зоне для части соединений наблюдаются наборы характеристических пиков – так называемые «отпечатки пальцев».

Область валентных колебаний двойных связей – 2000-1500 см-1. При образовании водородных связей с такими группами, как C=O, наблюдается низкочастотный сдвиг колебаний карбонильной группы. У карбоксильной группы при депротонировании происходит делокализация двойной связи, что сопровождается снижением частоты валентных колебаний. Также в этой области лежат пики Амид1 и Амид2, являющиеся аналитически важными для исследования белков.

Область связей X-H является высокочастотной - 2700-3800 см-1, т.к. частота поглощения зависит от силовой постоянной связи (поэтому частота поглощения увеличивается при увеличении кратности связи) а так же от молекулярной приведенной массы (которая ниже в этом типе связи из-за водорода).

Применение ИК-спектроскопии.

В отличии от, например, спектрофотометрии, ИК спектроскопия позволяет исследовать сложные системы (образцы пищевых продуктов, крови и т.д.), белки в составах агрегатов (тельца включения), интегральные белки в составе биомембран (с известным составом). Также возможно исследование самих коллоидных систем на основе биомолекул: суспензий (липосомы, иммобилизированные белки, нанокапсулы), гелей (полисахаридные гидрогели), эмульсий (мицеллы), пен, ленгмюровских пленок на поверхностях раздела фаз, нанобиосистем (которые можно формировать для изучения свойств взаимодействия различных белков и ферментов с биомембранами).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Прикладные аспекты ИК спектроскопии

- Медицинский анализ (анализ крови)
- Разработка лекарственных средств (суспензии, эмульсии, анализ каталитической активности значимых ферментов)
- Анализ пищевых коллоидных систем (шоколад, молоко, мороженое, майонез, соки, зефиры, мармелады и др., т.к. в пищевой промышленности важно, чтобы такие коллоидные продукты не расслаивались, проверять свежесть – образование перекисных связей вместо двойных отображается на ИК спектре и указывает на порчу липидов)

Получаемая информация:

- Концентрация
- Вторичная структура
- Агрегация
- Пространственная ориентация
- Кинетика реакций
- Микроокружение функциональных групп
- Взаимодействие в лигандами (определение констант)
- Гидратационное состояние

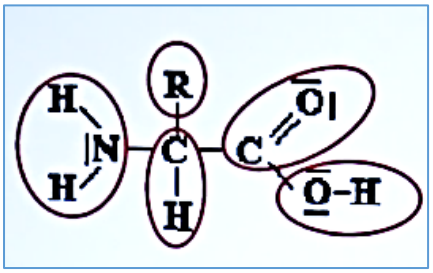


Рис. 5.2 Связи в молекуле, способные поглощать в ИК области

Белки состоят из огромного количества аминокислот, которые содержат по несколько связей, способных к валентным и деформационным колебаниям. Каким образом мы получаем пригодный к анализу спектр? Основной вклад в спектр вносит амидная связь в различных состояниях. (рис. 5.3)

Пик Амид А – область колебаний валентных связей X-H (не четко выражен, т.к. присутствуют колебания водородных связей воды). Амидные связи основной цепи представляют собой ~3 пика.

ν – валентные колебания, δ – деформационные

Амид 1 (расположен в интервале частот 1600-1700 см-1) – по его интенсивности определяется концентрация белка, форма используется для анализа вторичной структуры (в зависимости от формы полипептидной цепи каждому элементу вторичной структуры соответствует свой спектр в Амид1 области

ν(C=O)~80%
ν(C-N)~15%

Амид 1- колебание комбинированное – наблюдается, если функциональные группы близко расположены физически, и если их полосы поглощения расположены близко в спектре. Карбонильная группа образует водородные связи с NH группой пептидной связи, дипольный момент сонаправлен с альфа спиралью.

Амид 2 – определяется комплементарная информация, ориентация

δ(N-H)~60%
ν(C-N)~20%
ν(C-C)~10%

Деформационные колебания вносят больший вклад, поэтому интенсивность пика ниже, они расположены поперек альфа спирали, обладают определенной асимметрией, а значит, возможно померить их спектр дихроизма в ИК свете.

Амид 3 – (~1400 см-1), вклад боковых цепей, анализ затруднен, спектр слабо выражен по форме и интенсивности

δ(N-H)~80%
ν(C-N)~20%

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

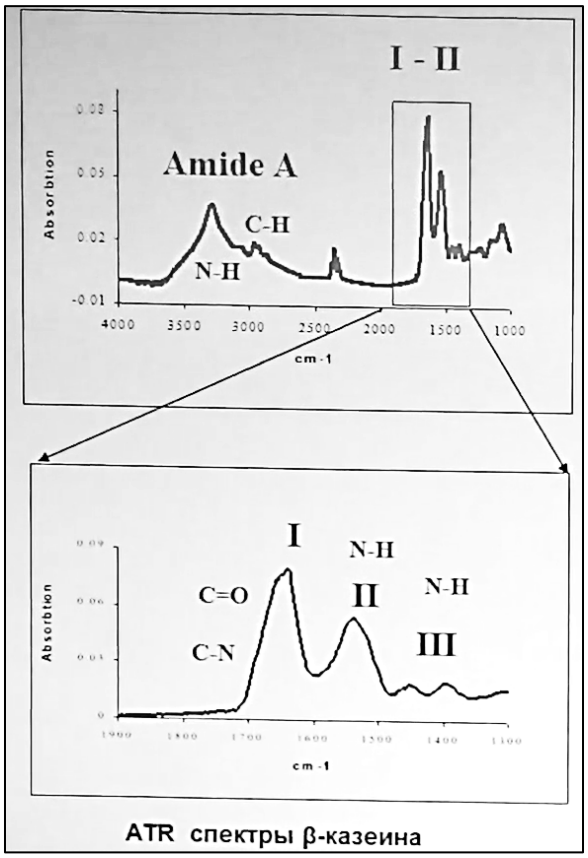


Рис. 5.3 ИК-спектры бета-казеина

Если белок модифицирован по аминогруппам лизина (например, модификация жирными кислотами для придания липофильных свойств), образуются дополнительные амидные связи. Когда таких модификаций много, то это вносят значительный вклад в Амид 1 область, и тогда спектр искажается. В таком случае можно либо моделировать и учитывать вклад этих амидных связей, либо переходить к анализу Амид 2.

Как ИК спектр реального белка отличается от спектра модельного пептида?

На рис. 5.4 мы видим сравнение их спектров. В роли модельного белка выступает полиглутаминовая кислота в альфа-спиральной конформации.
Мы видим, что ИК спектр модельного белка имеет более узкие и интенсивные пики, т.к. в этом случае окружение более гомогенное, разрешимые пики валентных колебаний CH и CH2 групп, разрешимый пик карбонильной группы.

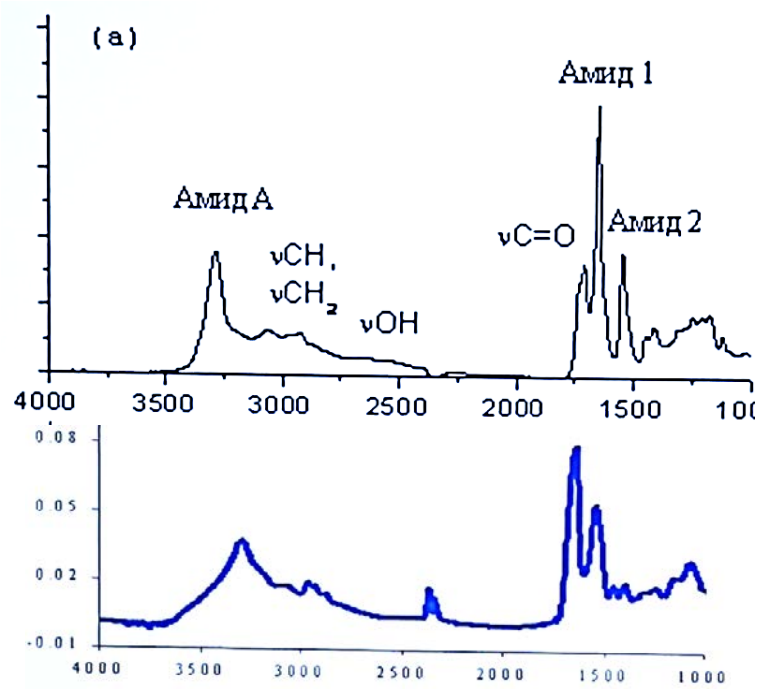


Рис. 5.4 Сверху – ИК спектр модельного белка, снизу – ИК спектр овальбумина

Спектр смеси несвязанных аминокислот также имеет Амид 1, Амид 2 и Амид 3. В области Амид 1наблюдаются колебания групп C=O, C-N; в области Амид 2 – отдельные пики депротонированной COO-, N-H; несущественный вклад боковых радикалов в области Амид 3.

Определение концентрации белка

По закону Бугера-Ламберта-Бера интенсивность полос поглощения пропорциональна концентрации вещества, соответственно по интенсивности пиков Амид1 или Амид2 возможно определить концентрацию содержащегося белка (рис. 5.5). Это достаточно точный метод, т.к. для разных белков в разных буферных растворах калибровка линейна в диапазоне от 0,1 до 65 мг/мл (рис. 5.6).

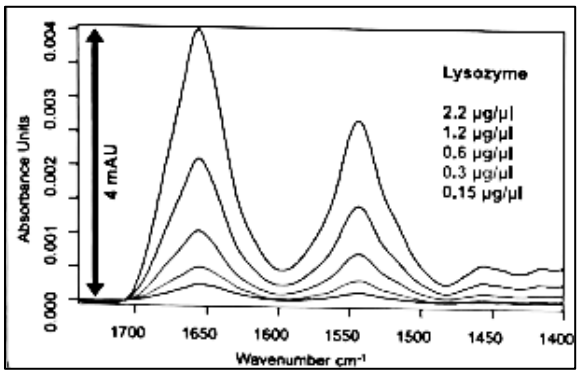


Рис. 5.5 Пример различий в интенсивности пиков ИК спектра в зависимости от концентрации белка

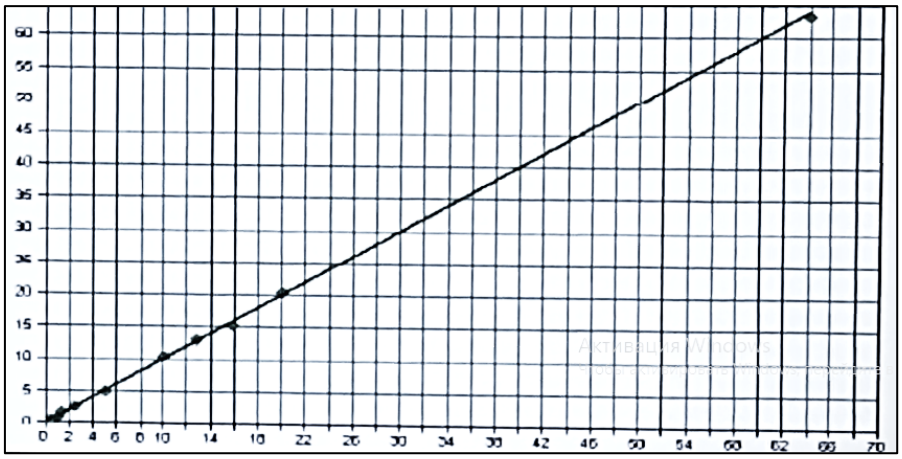


Рис. 5.6 Калибровочная прямая

Анализ вторичной структуры

Рис. 5.7 Возможные состояния полипептидной цепи (схема)

Каждой структуре соответствует своя форма ИК спектра. В конформации альфа спиралей: пик симметричный, интенсивность выше. В конформации бета-структуры: пик несимметричный, наблюдается присутствие плеча вблизи 1696 см-1(рис. 5.8) Пик альфа структуры более узкий, чем пик рандомной структуры. Бета структура имеет два пика справа и слева от центра, 1630-1640 и 1680-1690 см-1 соответственно. Таким образом, по сравнению с КД спектроскопией при ИК спектроскопии бета структуры идентифицируются лучше.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

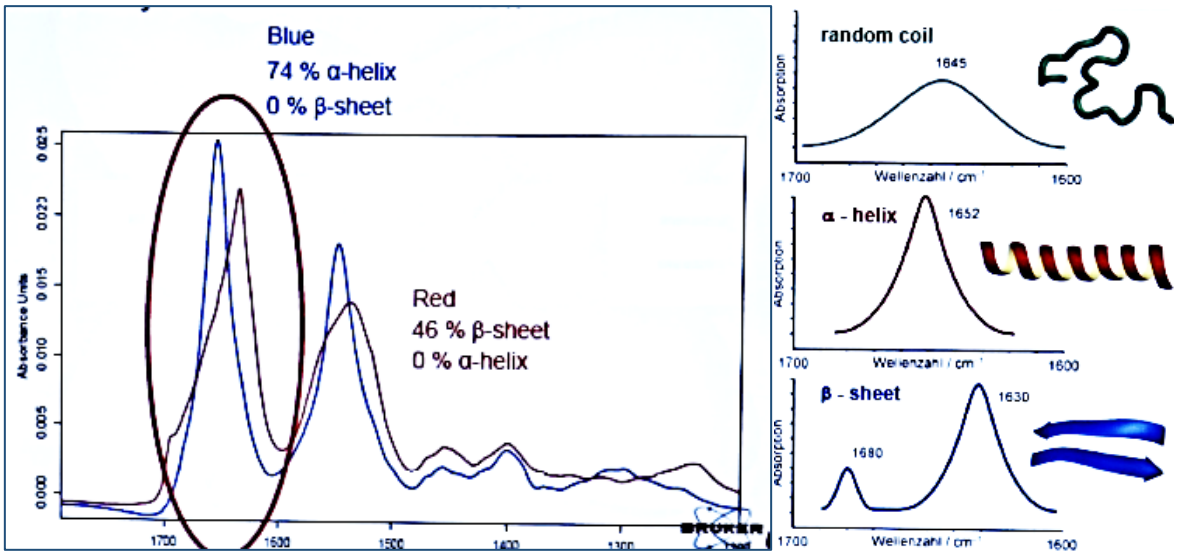


Рис. 5.8 Особенности ИК спектров белков, насыщенных соответственно альфа или бета структурами.

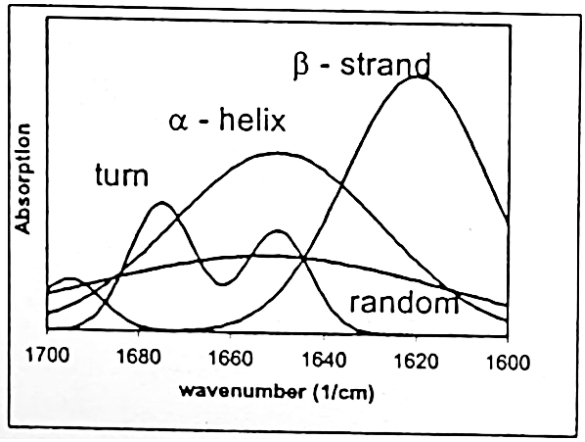


Рис. 5.9 ИК спектры отдельных элементов вторичной структуры с учетом коэффициентов молярного поглощения в Амид 1

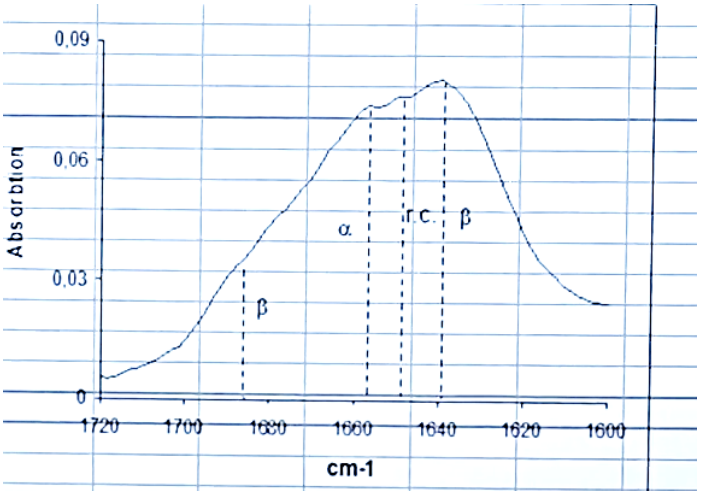


Рис. 5.10 Соотнесения пиков Амид1 области ИК спектра овальбумина

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

При слежении за интенсивностями пиков в спектре при воздействии различных внешних факторов (происходит термоденатурация, в органических растворителях, включение в системы, химическая модификация и тд) можно высчитывать, например, контанту денатурации, константы связывания.

Для количественного анализа существует программное обеспечение, которое позволяет анализировать пики отдельно. Для этого существует метод деконволюции, позволяющий разделить общий пик на характеристические пики структур и определить их количественное содержание (в %), проианализировать с учетом коэффициентов молярного поглощения (рис. 5.11)

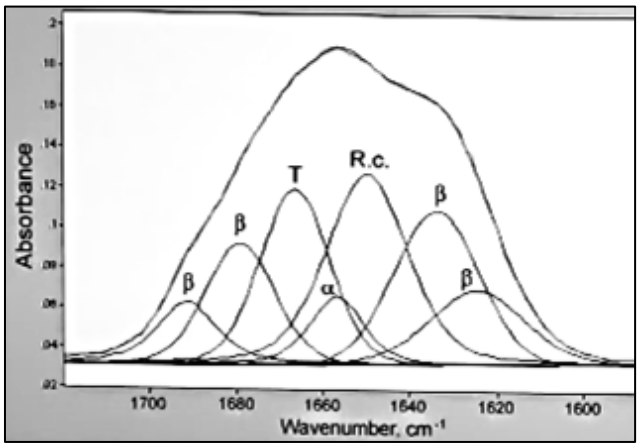


Рис. 5.11 Разделение общего спектра на характеристические для отдельных структур

Пример изменения ИК спектра при термоденатурации

Взят фермент рибонуклеаза, изучается его термоденатурация. Красная линия – спектр исходного состояния, голубая – спектр полностью денатурированного белка. Исходно мы видим бета белок (несимметричный пик 1636 см-1). При денатурации происходит деструктуризация и изменение в сторону уменьшения бета-структур. Пик становится более симметричным, начинают преобладать в основном рандомные структуры. После построения графика изменения интенсивности от температуры можно измерить константу денатурации при определенной температуре. В Амид 2 изменения менее выраженные: изменяется пик на 1550 см-1, в Амид 3 также происходят сравнительно небольшие изменения.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

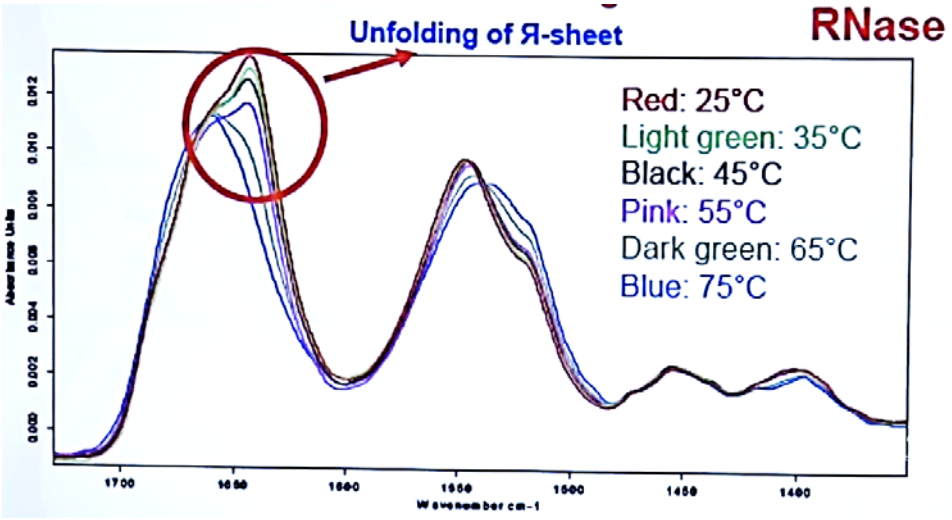


Рис. 5.12 Термоденатурация рибонуклеазы

Для получения более точной информации используется такой метод представления данных, как разностный спектр: из каждого последующего спектра вычитается изначальный спектр (изучается, как прогрессирует разница в спектрах)

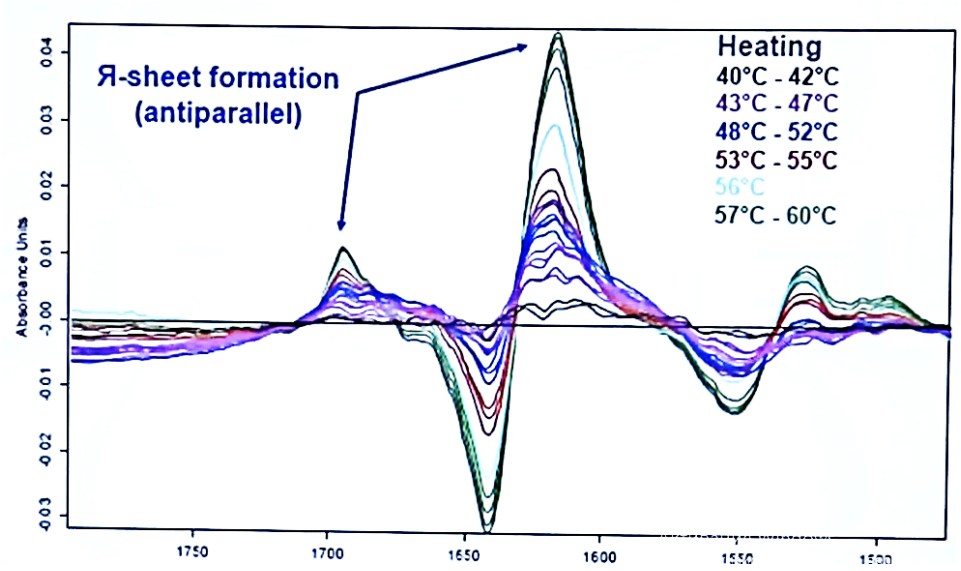


Рис. 5.13 Разностный спектр при термоденатурации

Еще один вид представления, который важен для определения и исследования изменений в белках – применение второй производной. Вторую производную применяли также в спектрофотометрии для разделения пиков. Вторая производная берется для улучшения разрешения пиков.

Мы видим, что для овальбумина первый пик (1600-1700 см-1) (рис. 5.14а) разрешается до нескольких пиков (рис. 5.14б). Небольшие пики по краям дифференциального спектра соответствуют пикам агрегированным антипараллельным бета структурам.

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ ПРОФ РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ НА VK.COM/TEACHINMSU

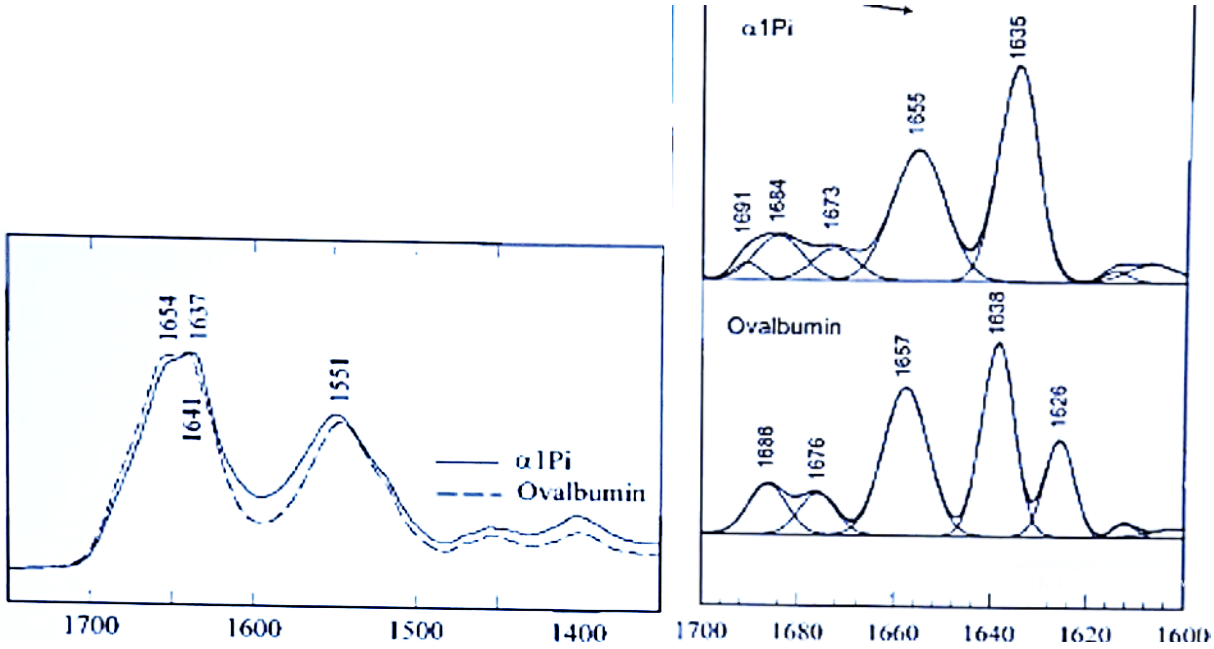


Рис. 5.14 а Исходный спектр овальбумина

б Дифференциальный спектр Амид1 области

За межмолекулярными антипараллельными бета структурами можно следить для исследования агрегации белка. Денатурация в случае альбумина приводит к исчезновения альфа структур, но появляются новые пики – 1624 и 1964, соответствующие бета структурам. Овальбумин при нагревании, соответственно, образует гели, что используется, например, в пищевой промышленности.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

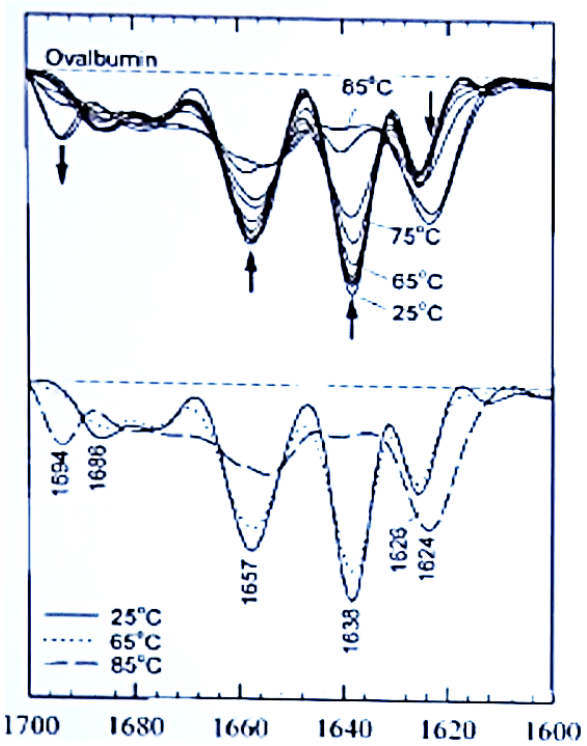


Рис. 5.15 ИК спектр овальбумина в нативном и агрегированном состоянии

Пероксидаза хрена высоко гликозилирована и не может агрегировать. Дело в том, что на поверхности молекулы есть заряд, а заряженные частицы отталкиваются и, соответственно, агрегации не происходит за счет сил электростатического отталкивания. При нагревании от 30 до 95 градусов в белке исчезают бета и альфа структуры (рис. 5.16, каждый пик соответствует своей структуре, для состояния нагревания спектр деструктурируется), в итоге получается одна сплошная рандомная структура на 1651 см-1, активности у такого фермента нет. Другая пероксидаза, допустим, пероксидаза табака, менее гликозилирована и является незаряженной, хотя и имеет такую же аминокислотную последовательность. В нативном состоянии она имеет пики бета структур 1637 см-1, рандомных структур 1645 см-1, альфа спиралей 1652 см-1, рандомных поворотов, а также пики спутники. При нагревании происходит снижение содержания альфа и бета структур, и в конце появляются ярко выраженные 1600 и 1684 см-1 пики. При образовании внутримолекулярных антипараллельных бета листов они были бы практически незаметными, но при образовании межмолекулярных становятся четко различимыми, что и говорит о процессах агрегации пероксидазы табака при нагревании.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

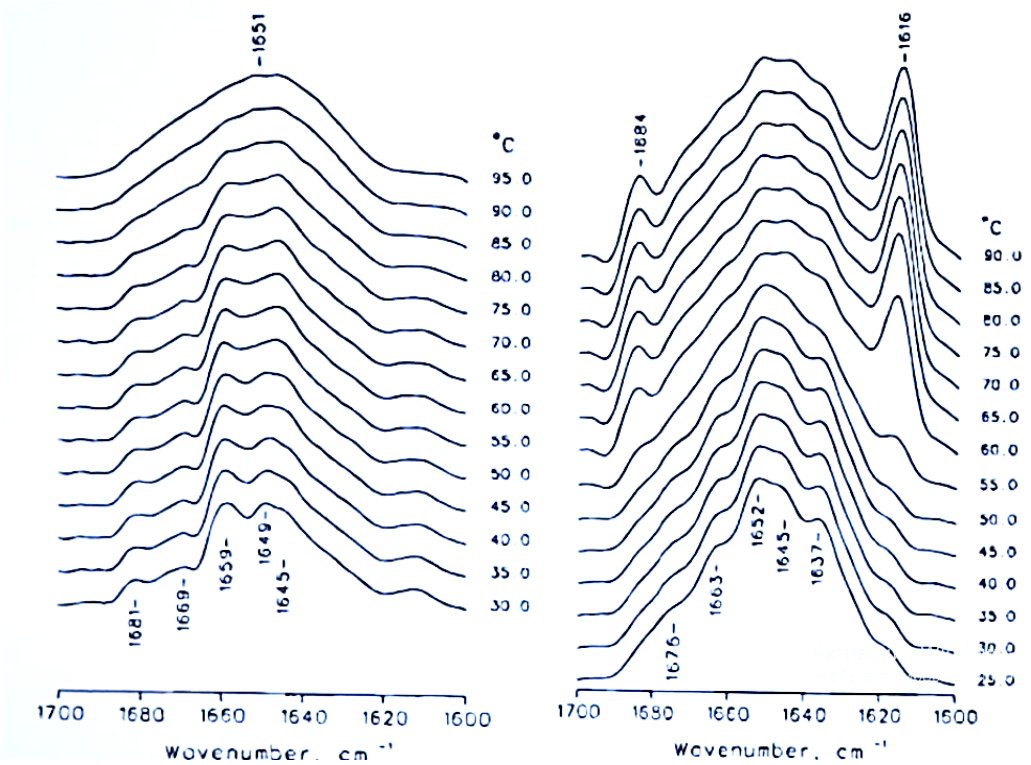


Рис. 5.16 (а) Пероксидаза хрена *(б) Пероксидаза табака*

Как уже упоминалось, можно использовать мицеллярный подход, который ползволяет: подбирать оптимальные условия сворачивания, изолировать молекулу фермента в отдельной мицелле, предотвращать агрегацию и образование межмолекулярных S-S связей. Таким образом, можно анализировать вторичную структуру ферментов в суспензии телец включения. Фермент, образующийся в виде телец включения – не растворим. Слежение за процессом сворачивания телец включения в обращенных мицеллах происходит в онлайн режиме.

Метод ик-спектроскопии позволяет нам анализировать пространственную ориентацию белков. Для этого мы определяем круговой дихроизм или же анизотропию, разницу между параллельной и перпендикулярной компонентами света.

В трансмембранных белках, как правило, есть альфа спирали, расположенные перпендикулярно бислою, перпендикулярен и их дипольный момент. Ориентацию элементов белка в мембране можно вычислить, измерив спектры белка в параллельном и перпендикулярном свете, определив их разницу. В зависимости от составляющих мембрану липидов спирали могут принимать различные ориентации (рис 5.18).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

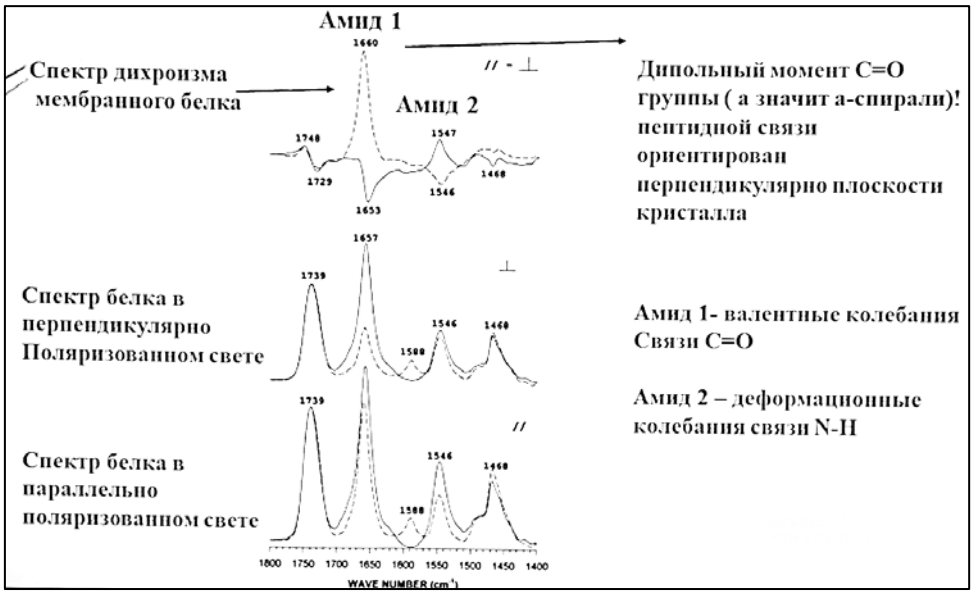


Рис. 5.17 Определение ориентации белка в мембране путем ИК спектроскопии

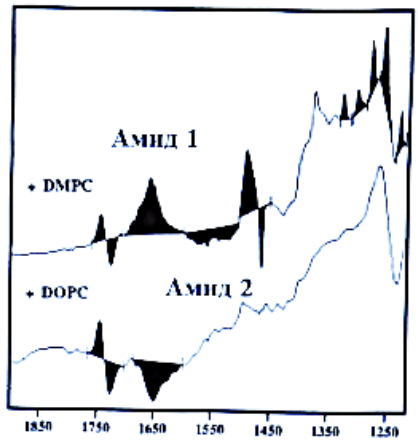


Рис. 5.18 Различная ориентация молекулы в зависимости от липидного состава мембраны

Важной методикой является определение каталитической активности ферментов с помощью ИК спектров.

Пример: гидролиз бензоилтирозинэтилового эфира химотрипсином. На спектре видно (рис. 5.19), что возрастают пики, соответствующие пикам продукта, и убывают пики субстрата.

Из изначального спектра формируется разностный спектр (рис. 5.20) и кинетические кривые (рис. 5.21)

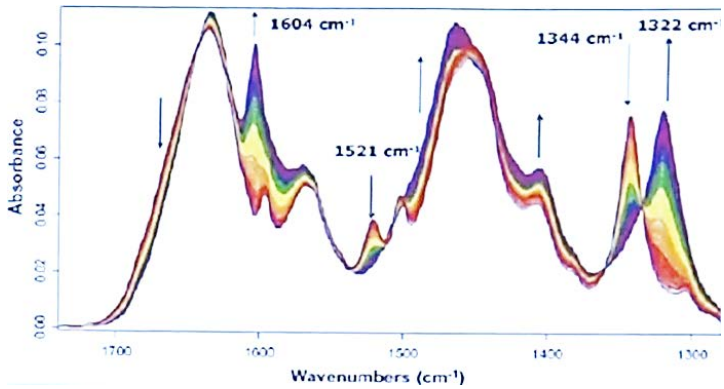


Рис. 5.19 ИК спектр реакции хипотрипсина

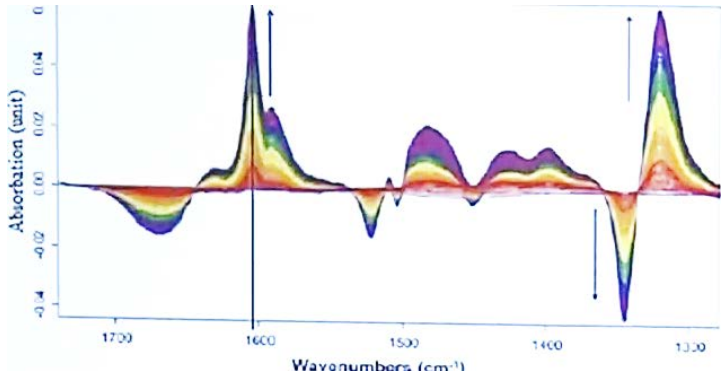


Рис. 5.20 Разностный спектр реакции

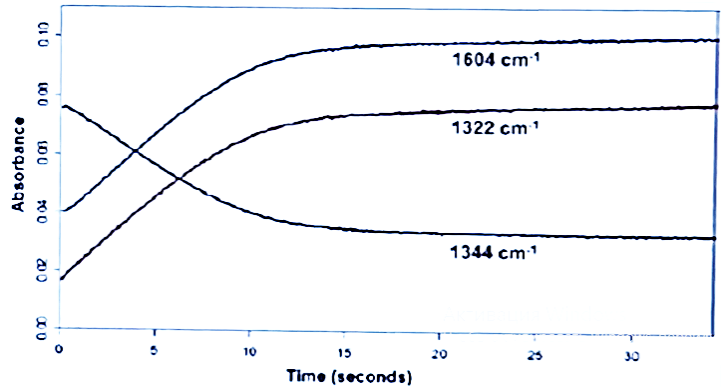


Рис. 5.21 Кинетические кривые

Из полной кинетической кривой можно определить кинетическую константу и Km.

Аспарагиназа – фермент, катализирующий превращение аспарагина в аспартат с выделением аммиака. Стандартным методом определения активности является учет выделяющегося аммиака методом Несслера, но это неудобно, т.к. метод не является непрерывным и не позволяет определять активность в коньюгатах, системах с полимерами и тд.

Вот так будет выглядеть исследование активности аспарагиназы с помощью ИК спектроскопии:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

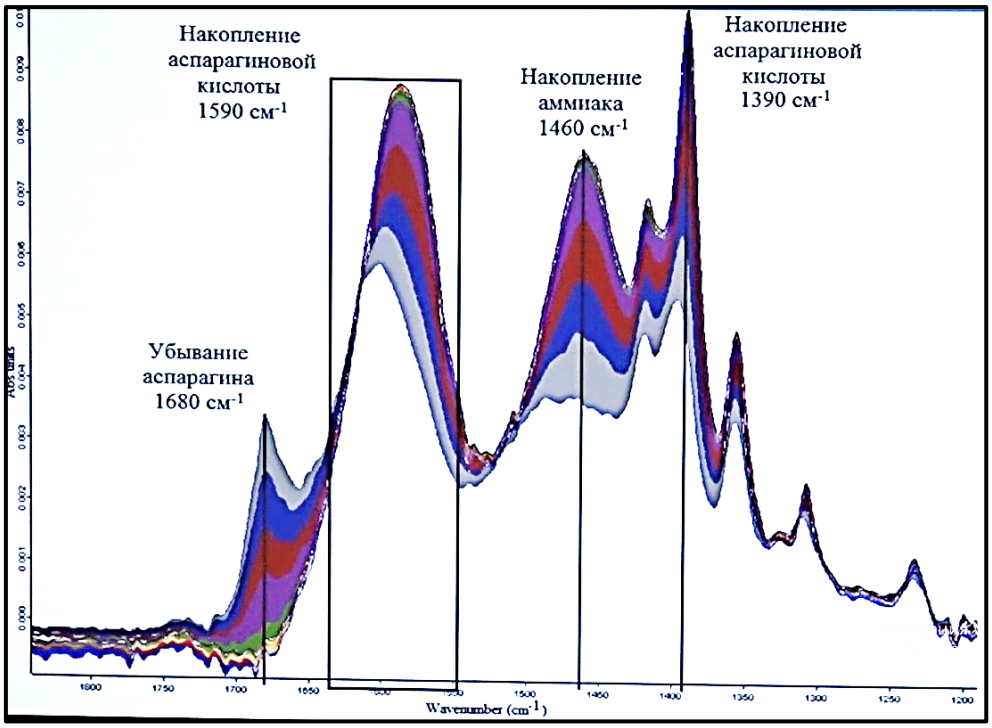


Рис. 5.22 ИК спектр реакции аспарагиназы

Для количественного определения параметров используют соответствующие калибровки: откладывается значение анатилитически значимого пика на 1680 см-1 от концентрации аспарагина (коэффициент поглощения будет тангенсом наклона этой кривой).

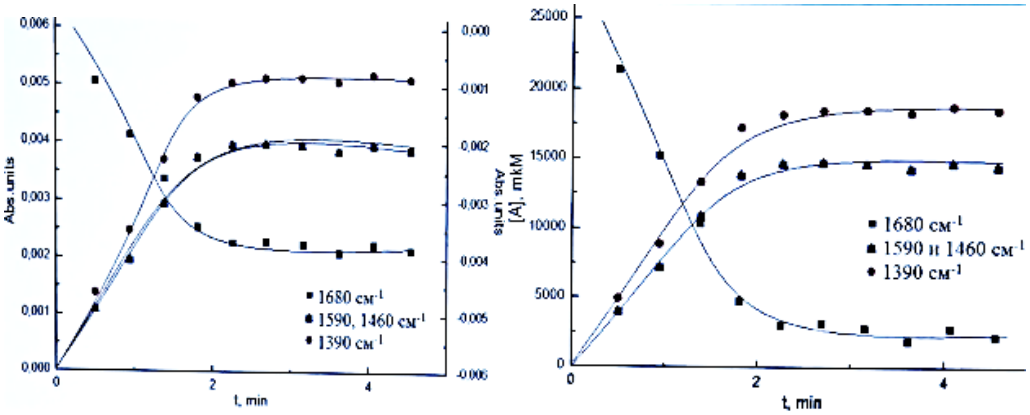


Рис. 5.23 Кинетические кривые. А- в единицах поглощения, Б – с учетом коэф. поглощения

Изучение состояния фосфолипидов

Липосомы - модельные замкнутые двуслойные липидные мембраны с водной полостью внутри. Бислой образован ацильными цепями жирных кислот. Типичные фосфолипиды мембран: фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол.

От липидного состава мембран зависит каталитическая активность ферментов, свойства мембранных белков, а также фазовый переход в липидах.

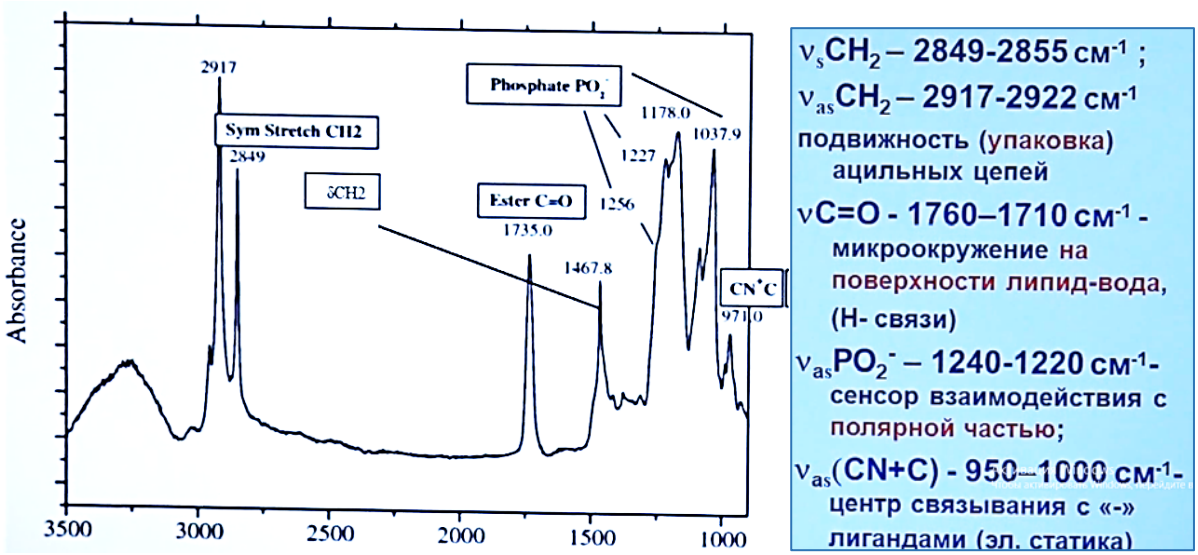


Рис. 5.24 ИК спектр липидов

Изучают мембраны в т.ч. в связи с исследованием влияния лекарств. Лекарственные препарату могут взаимодействовать с биомембранами и превращать их из атромбогенных в тромбогенные.

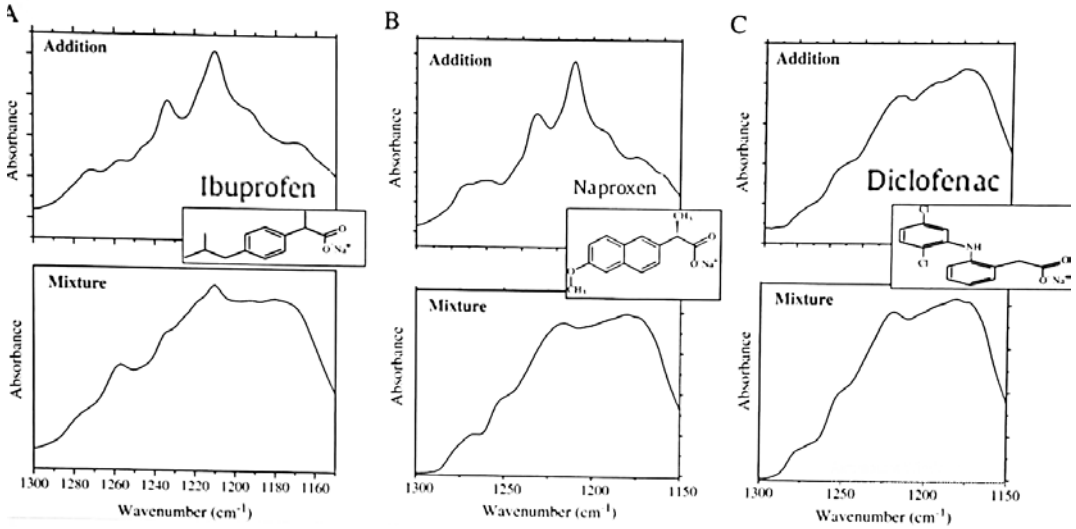


Рис. 5.25 Детекция взаимодействия молекул лекарств с фосфатной группой (1220 см-1 пик)

Если спектр физической смеси липисом и препарата отличается от механического сложени их отдельных спектров, то фосфатная группая взаимодействует с лекарственным компонентом, как в случае ибупрофена, в случае диклофенака же такого взаимодействия нет.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Контроль стабильности липосом методом ИК спектроскопии

Параметры контроля стабильности системы:

- Положение основных полос поглощения
- Ширина и интенсивность
- Тонкая структура полос

Нестабильные липосомы при хранении окисляются, аггрегируют. Комплексы с ПЭГ-хитозаном остаются стабильными на протяжении большого периода времени.

Применение ИК спектроскопии для изучения фазовых переходов в биомембранах.

Липидный бислой может находиться в двух основных состояниях : гель (ацильные цепи расположены ровно) и жидко-кристаллическое состояние. Изменение конформации липидных цепей сопровождается частотным сдвигом полос поглощения CH2 групп (2849-2855 см-1, 2917-2924 см-1). Также фазовый переход сопровождается увеличением подвижности гидрофобных цепей и увеличением гидратации карбонильных групп. Температура фазового перехода зависит от длины цепей, степени ненасыщенности липидов, а так же от общего липидного состава мембранны.

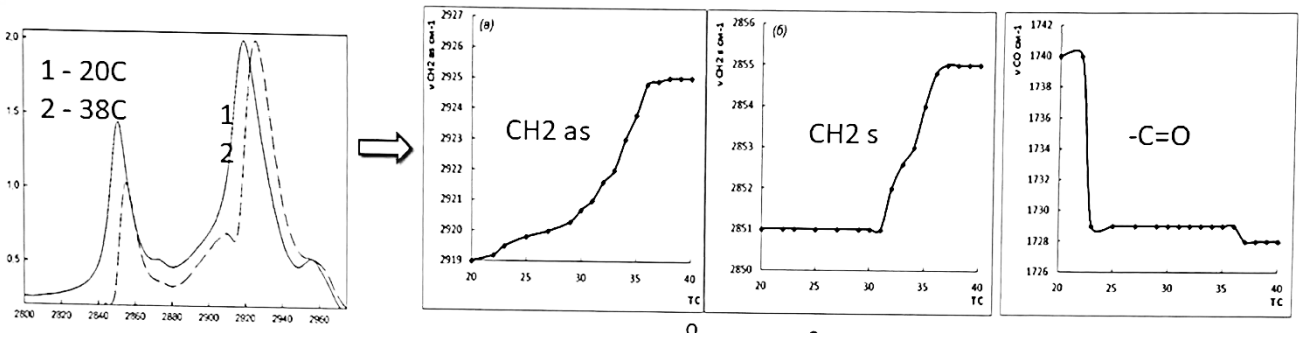


Рис. 5.26 Изучение фазового перехода липидной мембраны

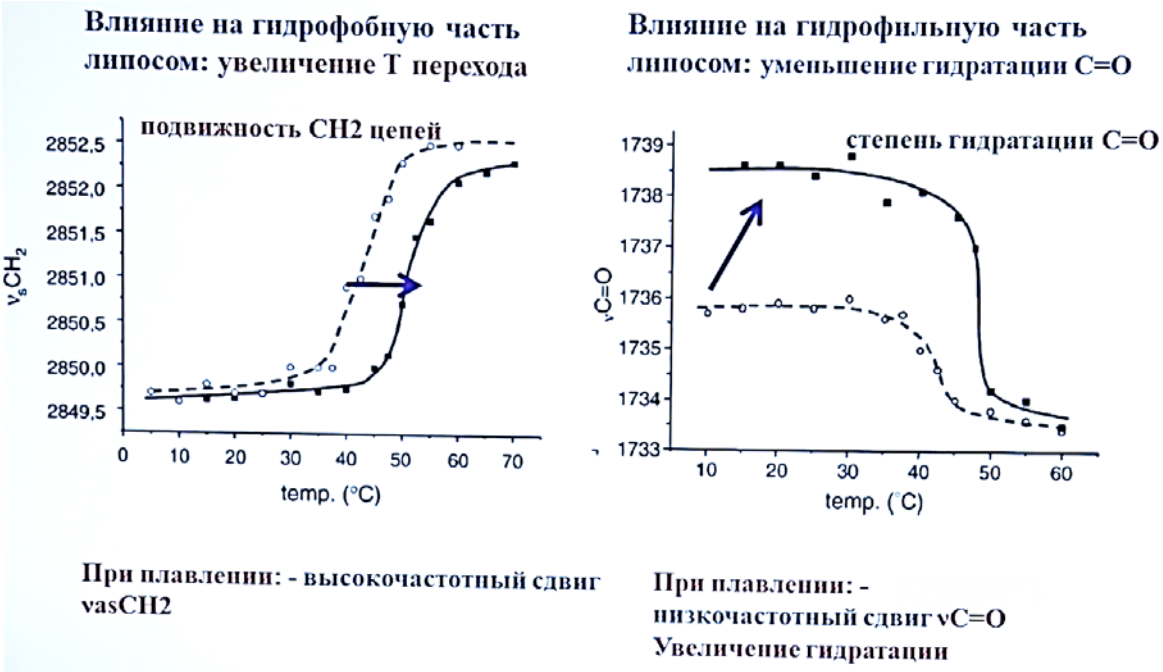


Рис. 5.27 Влияние фенольных липидов на температуру фазового перехода, микроокружение C=O групп

Взаимодействие липидов биомембран с лекарственными средствами

Ципрофлоксацин

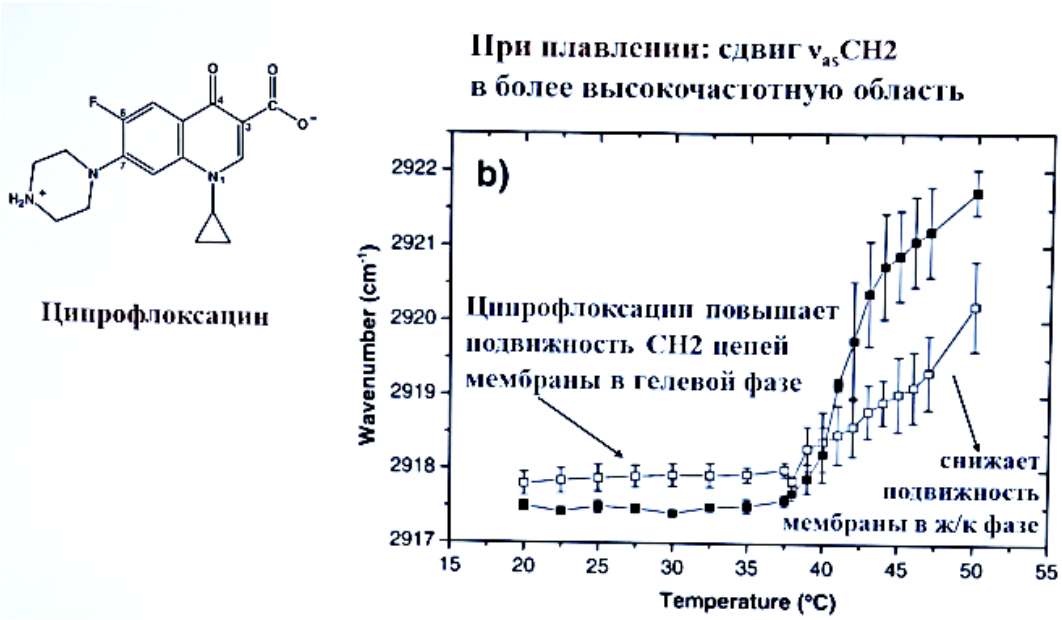


Рис. 5.28 Влияние ципрофлоксацина

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Моксифлоксацин

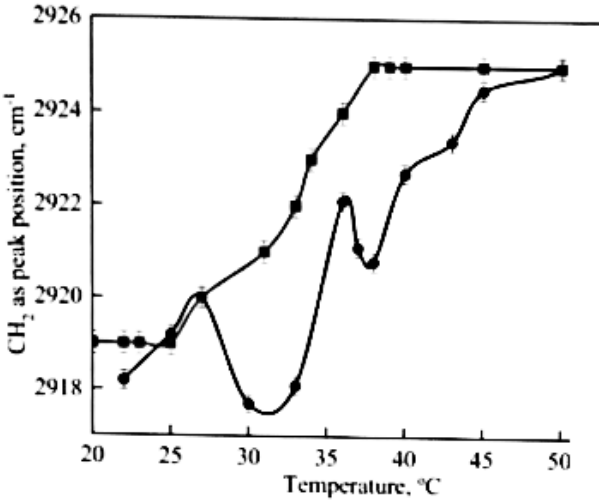


Рис. 5.29 Термограмма анионных липосом. Нижняя кривая – липосомы с добавлением моксифлоксацина. Пики соответствуют образованию двух видов комплексов за счет формирования электростатического взаимодействия между аминогруппами лекарственной молекулы и фосфатными группами кардиолипинов.

Взаимодействие липосом с поликатионами

- Полимеры связываются за счет образования электростатических связей с анионными группами липидов
- Гидратация снижается
- Текучесть снижается

Образец	Положение пика, $см^{-1}$			
	CH_2as	CH_2s	C=O	$PO_{2\,as}$
Липосомы	2920	2851	1737	1225
+ПЭГ-хитозан-90	2917	2849	1744	1263
+Поливинилпиридин	2917	2850	1742	1245

Интересным также является количественное определение констант диссоциации комплексов с различными лигандами. Для этого используются полосы поглощения фосфатных групп, которые и связывают полиэлектролит хитозан, наблюдается высокочастотный сдвиг, который соответствует снижению степени гидратации фосфатной группы. Определяется константа диссоциации, полученная величина кореллирует с изменением дзета-потенциала при взаимодействии хитозана с фосфатной группой кардиолипина, изменяется радиус молекулы (рис. 5.30).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

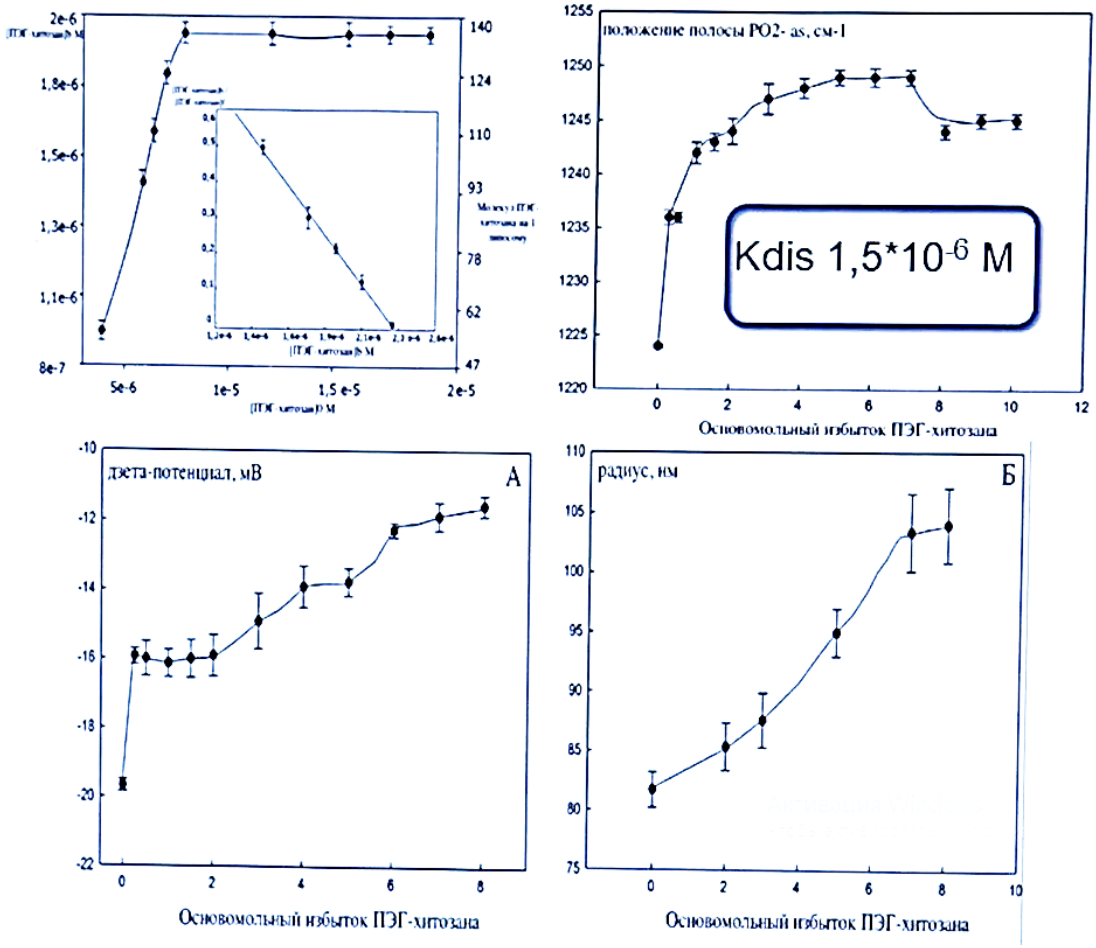


Рис. 5.30 Взаимодействие липосом с хитозаном

Интересно, что эти электростатические взаимодействия ослаблены в условиях высокой ионной силы, комплексы с хитозаном не образуются.

Положение полосы поглощения, $см^{-1}$	Липосомы	Липосомы – ПЭГ-хитозан	
	I = 0,05 M	*I* = 0,05 M	*I* = 0,2 M
vC=O	1739	1744	1739
vPO_2^-	1225	1263	1224
vCH_2 as	2920	2917	2919

Диагностика взаимодействия липидной мембраны с лекарственными молекулами

Включение в липосомы лекарственных молекул моксифлоксацина приводит к снижанию поглощения карбонильной и фосфатной групп, при этом влияния на гидрофобные ацильные цепи не оказывается. То же самое наблюдается для молекул доксорубицина.

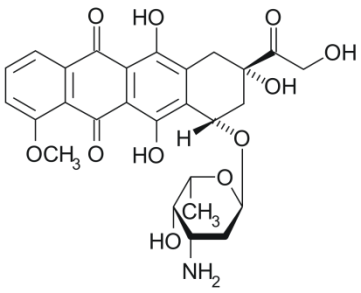


Рис. 5.31 Доксорубицин

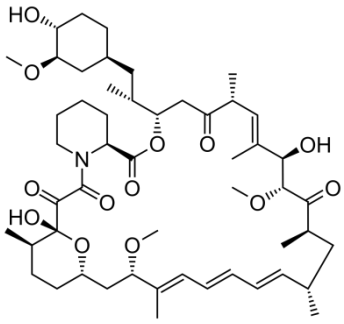


Рис. 5.32 Рапамицин

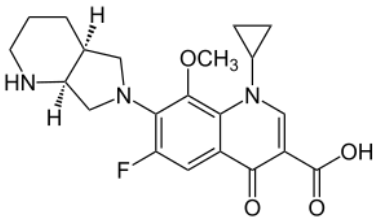


Рис. 5.33 Моксифлоксацин

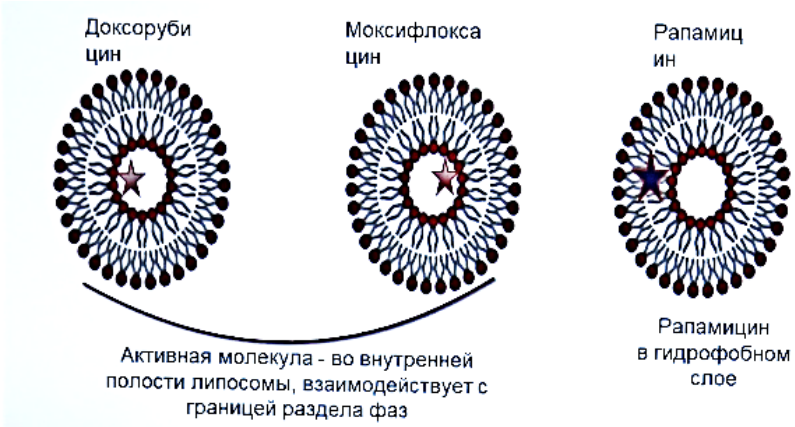


Рис. 5.34 Расположение лекарственных молекул в липосомах в зависимости от структуры активной молекулы

Лекция 6

Основные понятия метода Ядерного Магнитного Резонанса

Практически все элементарные частицы имеют магнитные моменты, и представляет собой, упрощённо, маленькие магнитики. У электрона спиновое квантовое число равно ½, т.е. может принимать две ориентации в магнитном поле. То же самое относится к протону и нейтрону. Протоны и нейтроны складывается в ядра и либо компенсируют друг друга, либо складывается. Так, например, дейтерий имеет спин 1, а C12 - 0, т.е. имеет магнитно неактивное ядро. C13 опять имеет спин ½. Наиболее подходящими для магнитного резонанса являются ядра со спином ½. Такие вот ядра при помещении их в магнитное поле принимают какие-то преимущественные ориентации, скажем, вниз-вверх по магнитному полю, и между этими двумя положениями есть разница энергии, возможны переходы с поглощением или испусканием кванта электромагнитного излучения пропорционально величине магнитного поля и магнитного момента.

Ядерный магнитный резонанс, как и электронный парамагнитный резонанс - это метод, полностью относящийся к классическим спектральным методам: мы наблюдаем поглощение или испускание кванта электромагнитного излучения.

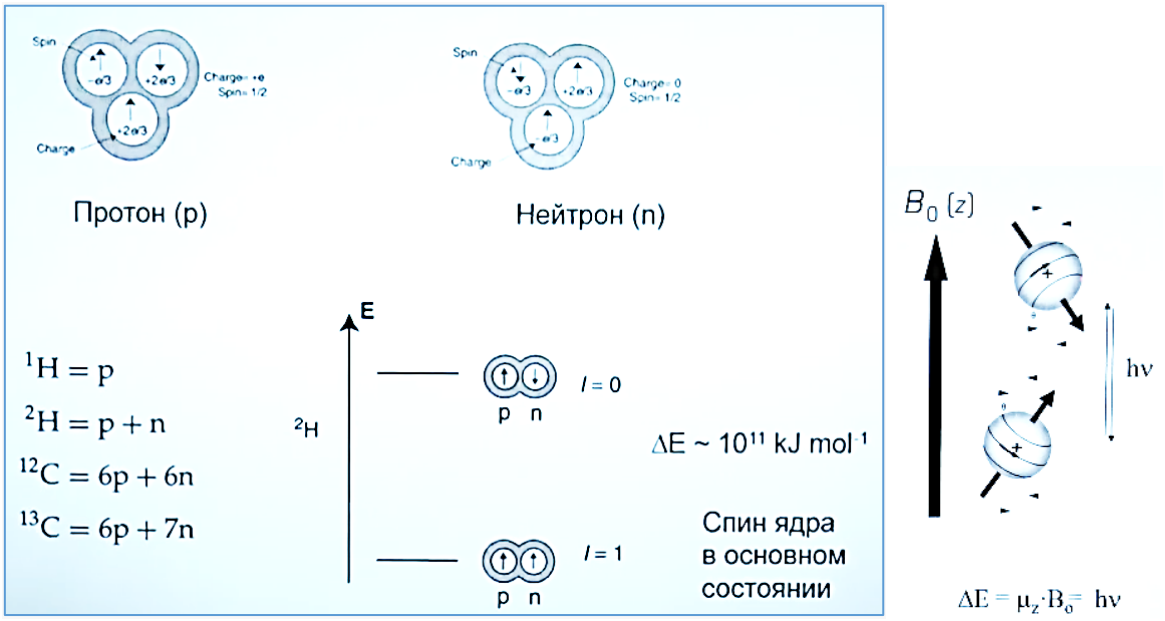


Рис. 6.1 Протоны и нейтроны. Положения, принимаемые частицей в магнитном поле.

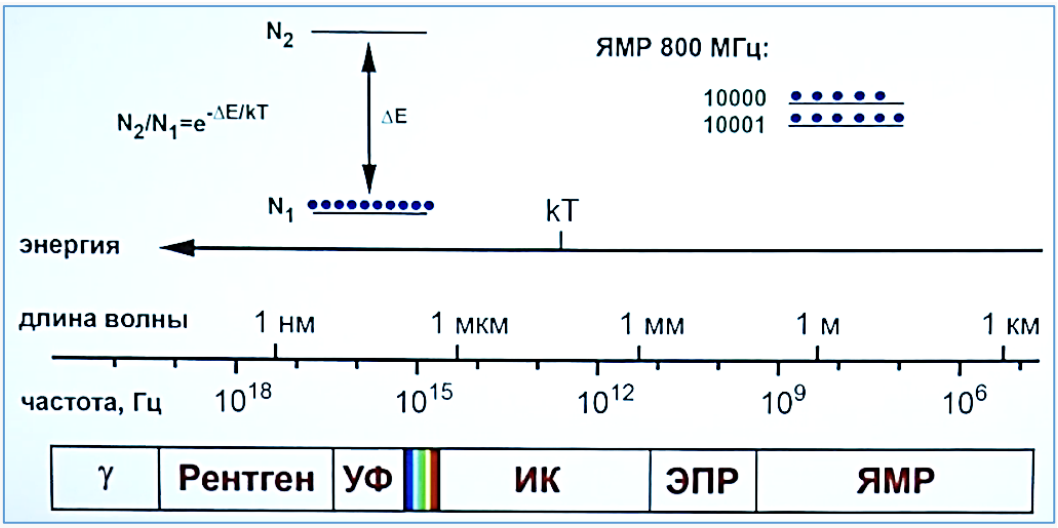


Рис. 6.2 Положениея области ЯМР на общем спектре и др. параметры

Населённость верхнего и нижнего уровня равна ΔE/kT. Когда перехода энергия выше kT, то населённость всегда будет внизу, и мы будем видеть все частицы, скажем, все электроны, все атомы и так далее, которые есть в ансамбле. Когда энергия переходов оказывается гораздо меньше kT, то верхний и нижний уровни выравниваются, то есть энергии за счет больцмановского теплового распределения практически так сказать оказываются равными. Например, для перехода ядерно-магнитного резонанса на частоте протонов 800 МГц, при наличии ансамбля из 20001 протона, только один протон окажется способным перейти, всё остальные будут уравновешены между нижним и верхним уровнями. Этот эффект, маленькая энергия переходов. В этом есть и свои плюсы: не нарушается ансамбль спинов, очень мягкие воздействия на изучаемый объект.

Таблица 1. Изменения в зависимости от температуры

	NMR			EPR	
T (K)	100 MHz	600 MHz	900 MHz	K: 24 GHz	W: 95 GHz
0.001	99.1764	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000
0.01	38.1170	94.3840	98.6691	100.0000	100.0000
0.1	4.6859	25.0204	35.0746	99.9990	100.0000
1	0.4788	2.8385	4.2274	68.3939	98.9530
5	0.0959	0.5743	0.8601	20.5755	59.8222
10	0.0480	0.2875	0.4310	10.8796	36.6141
50	0.0096	0.0576	0.0863	2.2773	8.7152
100	0.0048	0.0288	0.0432	1.1452	4.4569
273	0.0018	0.0105	0.0158	0.4210	1.6562
308	0.0016	0.0093	0.0140	0.3733	1.4694

Наиболее эффективно было бы ЯМР при заморозке объектов до абсолютного нуля (kT - зависимость от температуры). В реальности, когда мы работаем при температурах близких к комнатным, то, практически, для ЯМР на 600 МГц характерен примерно 1 процент населенности нижнего уровня.

История ядерного магнитного резонанса

Впервые эффекты, связанные так или иначе с магниторезонансными явлениями, наблюдали Отто Штерн и Вальтер Герлах в 1922 году. Они обнаружили магнитные моменты ядер в пучках атомов в магнитном поле; это был чисто физический эксперимент в газовой фазе. Приблизительно в те же годы (1924) Вольфганг Паули ввел спиновое квантовое число электрона. В 30м году, развивая эксперименты Штерна и Герлаха, Исидор Раби исследовал магнитные свойства ядер в атомных пучках, за что впоследствии и получил Нобелевскую премию. Надо сказать, что Нобелевских премий в области ядерного резонанса было много:

- Isidor Isaac Rabi: за резонансный метод записи магнитных свойств атомных ядер
- Felix Bloch и Edward Mills Purcell: за создание нового метода измерения идерной магнитной прецессии и последующие связанные с ним открытия
- Richard R. Ernst: за вклад в развитие методологии спектроскопии ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. Им была разработана методика Фурье-спектроскопии, двумерной спектроскопии
- Kurt Wuthrich: за развитие методов спектроскопии ядерного магнитного резонанса для исследования трехмерной структуры биологических макромолекул в растворе
- Paul C. Lauterbur и Peter Mansfield: за открытия в области визуализации биообъектов.

Также невозможно не упомянуть человека, являющегося пионером всей этой череды исследований – Завойский Евгений Константинович (1907-1976). В 1941 г он впервые зарегестрировал сигнал ядерного магнитного резонанса, и в 1944 г была опубликована работа, посвященная открытию явления электронного парамагнитного резонанса.

Основы ЯМР

Спектр ядерного магнитного резонанса – зависимость интесивности сигналов от частоты, но в реальности мы получаем сигнал в виде так называемого спада свободной индукции (рис. 3), когда после подачи электромагнитного испульса на систему ядерных спинов возникает прецессия суммированного магнитного момента. После Фурье преобразования получается спектр.

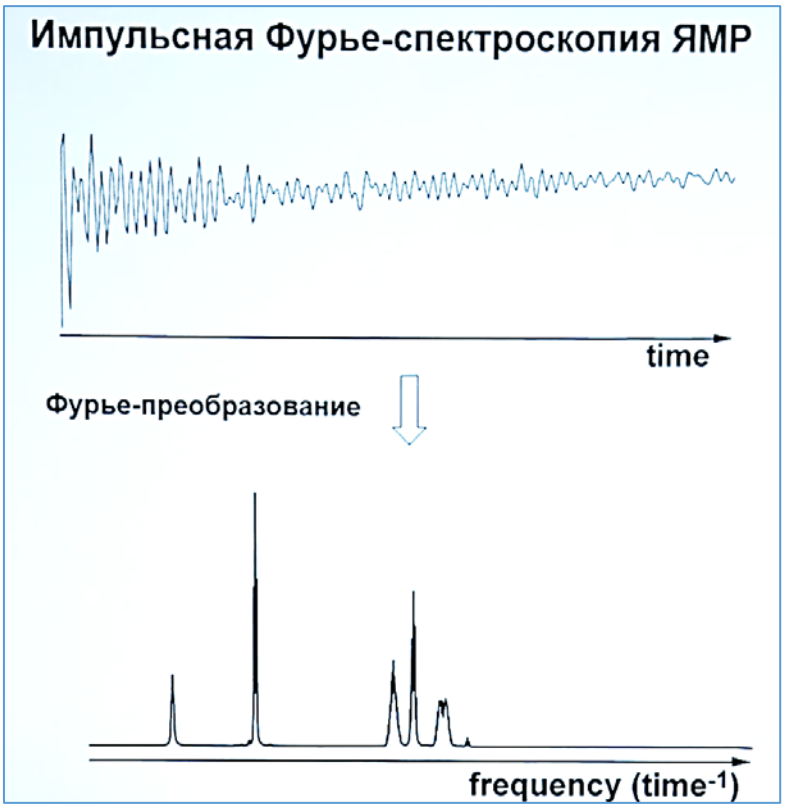


Рис. 6.3 Спад свободной индукции до и после Фурье преобразования

Резонансная частота зависит от гиромагнитного отношения (свойство ядра) и величины магнитного поля:

$$\omega = \gamma \cdot \mathbf{B}$$

1. В различных частях молекулы различное магнитное поле (экранирование электронов): химический сдвиг.

2. Существует взаимодействие с магнитными моментами неспаренных электронов.

3. Существует взаимодействие с магнитными моментами окружающих ядер через пространство: диполь-дипольное взаимодействие.

4. Существует взаимодействие с магнитными моментами соседних ядер через систему валентных электронов: спин-спиновое взаимодействие.

Взаимодействия ядро-ядро, ядро-электрон и ядро-электрон-ядро и являются основой информации ЯМР.

Свойства некоторых биологически важных ядер

Одним из самых важных ядер является протон. Во-первых, он присутствует во всех биомолекулах: белках, нуклеиновых кислотах и тд. В0-вторых, это очень чувствительное ядро, а содержание магнитно активного изотопа со спином 1/2

составляет практически 100%. Следующим идет углерод. Углерод безусловно важен, но содержание магнитно активного изотопа составляет всего лишь 1%, и гораздо меньше его абсолютная чувствительность. ^{15} N тоже является основой строения белков, нуклеиновых кислот и тд, но содержание магнитно активного составляет 0,37, гиромагнитное отношение в 10 раз меньше по сравнению с протонами. Фосфор, у него также 100% содержания изотопа, хорошая чувствительность. Фтор - довольно любопытен, т.к. его практически нет в живой природе, а по свойствам близок к протонам. Соответственно, можно вводить в различные системы фтор, не получая никакого дополнительного фона.

Таблица 2. Свойства некоторых биологически важных ядер

Ядро	Спин	Резон. частота МГц	Гиромаг-нитное отношение (10^7 rad $s^{-1}T^{-1}$)	Относит. чувстви-тельность	Природное содержание %	Абсолютн. чувстви-тельность
^{1}H	½	600	26.7522	100.00	99.98	100.0000
^{13}C	½	150	6.7283	1.59	1.11	0.0176
^{15}N	½	60	-2.7126	0.10	0.37	0.0004
^{17}O	5/2	81	-3.6280	2.91	0.04	0.0011
^{19}F	½	564	25.1815	83.00	100.00	83.0000
^{23}Na	3/2	159	7.0704	9.25	100.00	9.2500
^{31}P	½	243	10.8394	6.63	100.00	6.6300
^{77}Se	½	114	5.1214	0.69	7.58	0.0525

Важнейшие области применения методом ЯМР в биологии и медицине

- изучение строения и свойств низкомолекулярных биологически активных соединений
- определение структуры биомакромолекул (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы)
- изучение динамических свойств биомолекул
- мониторинг белок-лигандных взаимодействий(ЯМР скрининг биологически активных соединений)
- изучение строения и свойств биологических мембран
- мониторинг состава биологических жидкостей (метабономика)
- визуализация объектов живой и неживой природы (ЯМР томография)
- мониторинг процессов, происходящих в живом организме (in-cell ЯМР, in-vivo спектроскопия)
- исследование функциональной активности мозга (f-MRI)

Первый ЯМР спектр белка был опубликован в 1957 г. (рис. 6.4); к этому времени органические молекулы в аспектре метода ЯМР были уж достаточно хорошо изучены: были известные различные контакты, сдвиги и др. параметры. Джон Киркуд растворил рибонуклеазу А (20% р-р, и, на самом деле, при такой концентрации непонятно, то ли это раствор, то ли гидратированный белок; такая концентрация была необходима из за низкой чувствительности метода) в D2O и получил спектр ЯМР. Были предположены значения пиков, но ни о каком анализу структуры из такого спектра речи быть не могло.

Рис. 6.4 Первый опубликованный ЯМР спектр рибонуклеазы А.

Почему, не смотря на большое количество знаний о ЯМР органических соединений, получился только такой ЯМР спектр белка? Есть три причины, которые необходимо помнить.

Особенности спектров ЯМР белков

1. Много сигналов резонансов, в том числе перекрывающихся.

2. Белок, в отличие от многих других органических соединений – это крупная молекула, которая вращается в растворе на порядки медленнее. Время корреляция белковых молекул – от единицы до десятков наносекунд. Медленное вращение приводит к сильному уширению линий сигналов (высокая скорость релаксации из за медленного движения биомолекул в растворе). Ширина линии одиночного протона белка будет достигать 10-30 Гц, а то и сотни.

3. Высокая дисперсия химических сдвигов (эффекты кольцевых токов окружающих ароматических остатков и карбонильных групп не усредняются по времени). Часто возникает ситуация, когда протона находится над или в плоскости ароматического кольца. Каждое ароматическое кольцо имеет систему сопряженных пи электронов, которые создают ток и наводят довольно мощное магнитное поле, возникает некий магнитный момент системы пи-электронов. Протоны, находящиеся в перпендикулярной и параллельной плоскости довольно ощутимо смещаются (на милионые доли)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

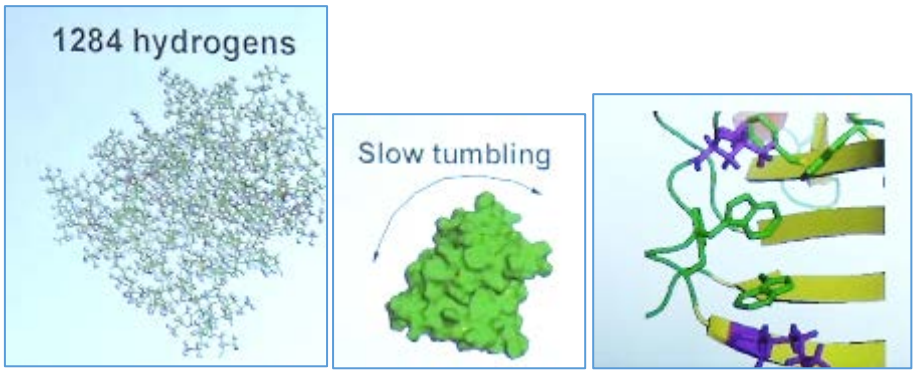


Рис. 6.5 Иллюстрация основных аспектов особенностей ЯМР белков

Спектры ЯМР-^{1}Н белков

На рис. 6.6 (снизу вверх) изображены:
1. Спектр лизина.
2. Спектр неструктурированного полипептида, 16 аминокислотных остатков, узкие линии, появились новые пики.
3. Спектр структурированного глобулярного белка, 162 аминокислотных остатка, есть ризонансы в 10ти, есть в минусовой зоне.

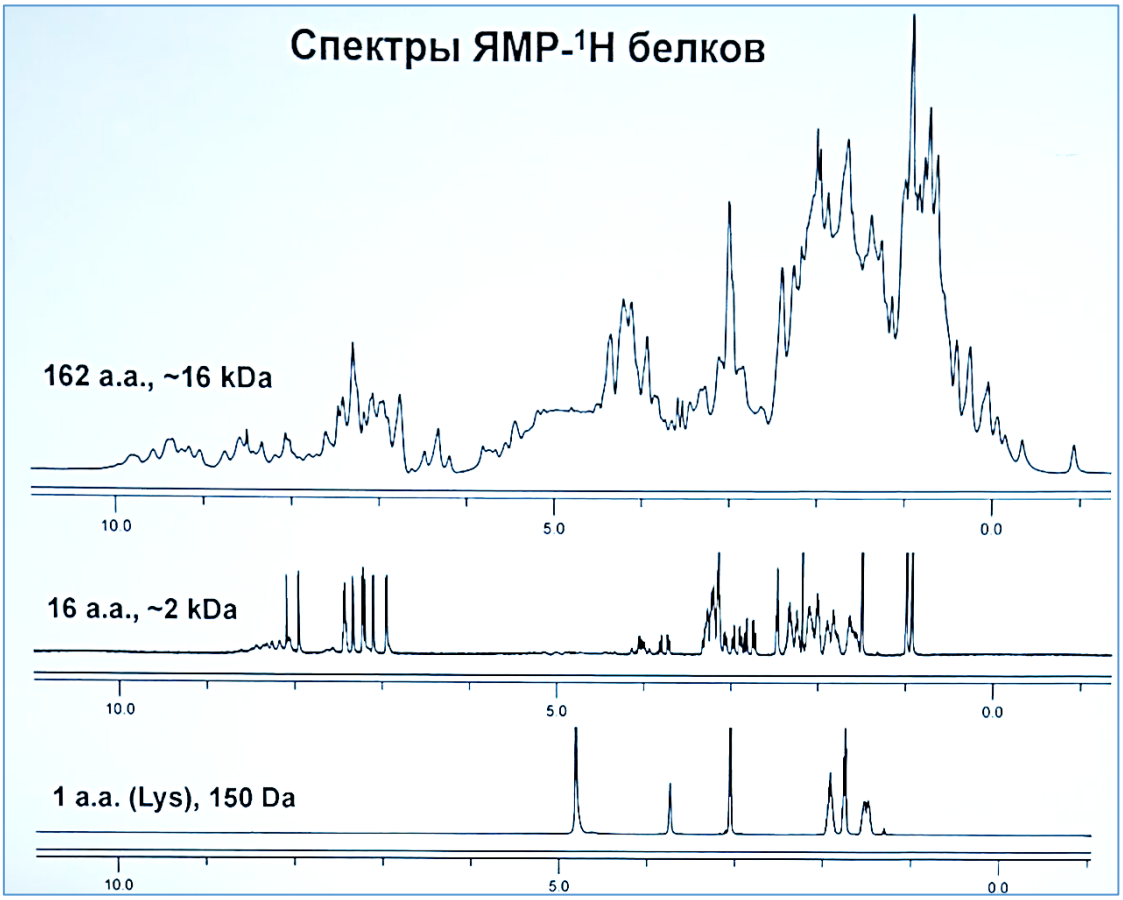


Рис. 6.6 Спектры аминокислоты, полипептида, белка

Двумерная спектроскопия ЯМР

Большой вклад в развитие методологии спектроскопии ЯМР внес Ричард Эрнст. В 1974 году он создал метод 2D спектроскопии ЯМР, хотя и саму идею двумерной спектроскопии предложил Джин Джинер в 1971 г. Далее они вместе в 1979 году разработали метод NOESY.

При измерении одномерного спектра наблюдается спад свободной индукции, а затем он преобразуется с помощью Фурье преобразования в зависимость амплитуды от частоты.

Теперь возьмем два импульса и начнем делать серию измерений спектров с изменением времени T этого интервала между двумя импульсами. После преобразования набора полученных спектров и их совмещение оказывается, что возникает еще одна ось, на которой возникает снова нечто подобное сигналу свободной индукции. В этом направлении делаем второе Фурье преобразование, получаем две оси с частотами и некий сигнал. Это простейший просто иллюстративный, и на самом деле здесь появляются огромные возможности, какие импульсные последованности мы будем делать (но в каждой из них будет какой-то интервал, в котором будет варьироваться время).

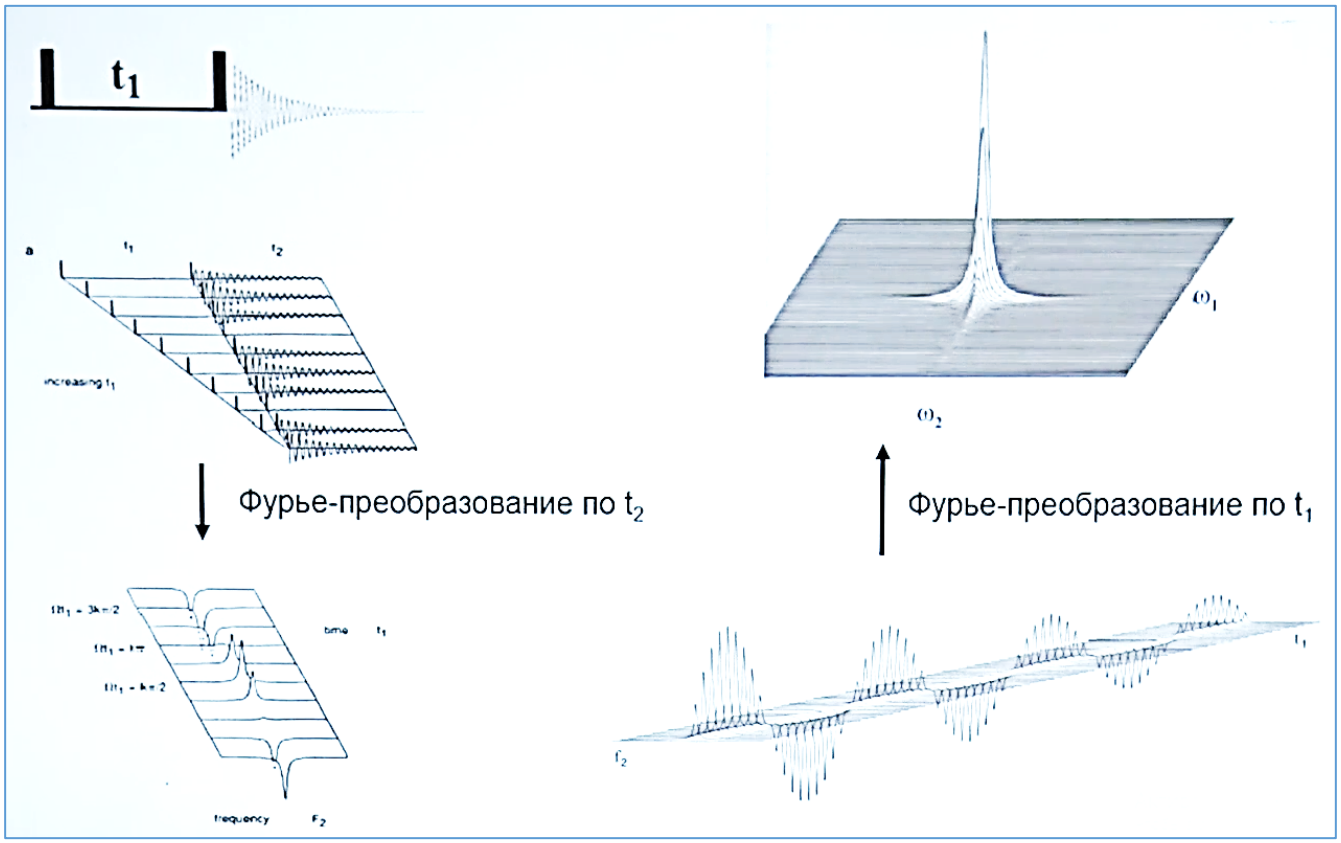


Рис. 6.7 Двумерная спектроскопия ЯМР

Гомоядерные (1H-1H) 2D методы ЯМР

COSYcorrelation spectroscopy – кросспик наблюдается там, где присутствует большая константа спин спинового взаимодействия

TOCSY TOtal Correlated SpectroscopY – смешивает всю спиновую систему

NOESY nuclear Overhauser effect spectroscopy (эффект, когда меняется населенность одного ядра при насыщение второго рядом находящегося ядра) – наблюдается в добавок взаимодействие между спиновыми системами

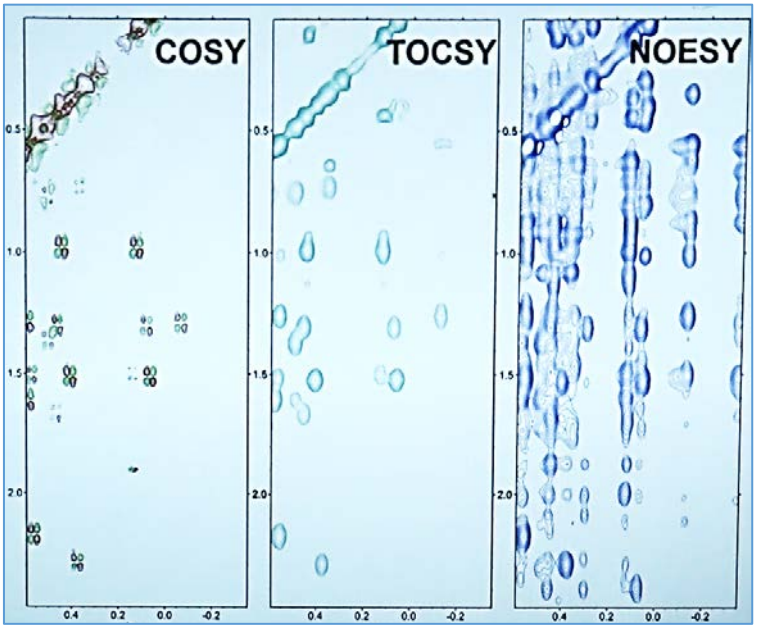


Рис. 6.8 Гомоядерные методы ЯМР

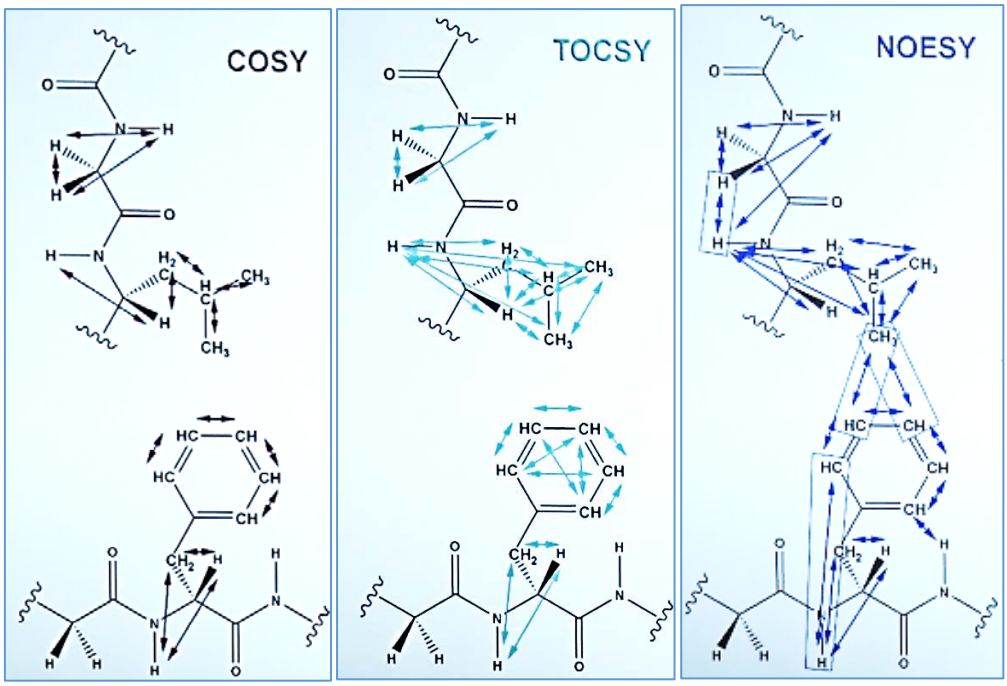


Рис. 6.9 Спиновые системы, учитывающиеся в разных методах

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Метод последовательного отнесения сигналов боковой цепи

Есть фрагмент, 7 аминокислотных остатков. Допустим, что мы знаем положение первой корреляции CH-альфа, видим эту корреляцию в спектре TOCSY и в NOESY. Длебующим идет протон от N A2. Увидим эту корреляцию только в NOESY. Проведя линию вверх, видим собственный резонанс аланина. Вновь проводим горизонтальную линию до следующего резонанса H от остатка глутамата E3, проведя линию вверх видим его собственный резонанс. Таким образом последовательно находим резонансы всех аминокислотных остатков (рис. 6.11).

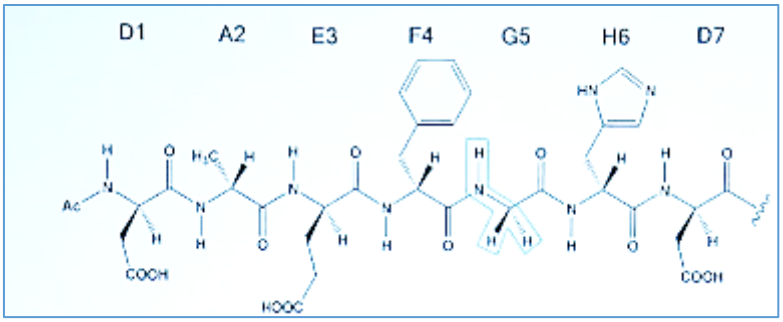


Рис. 6.10 Модельный полипептид

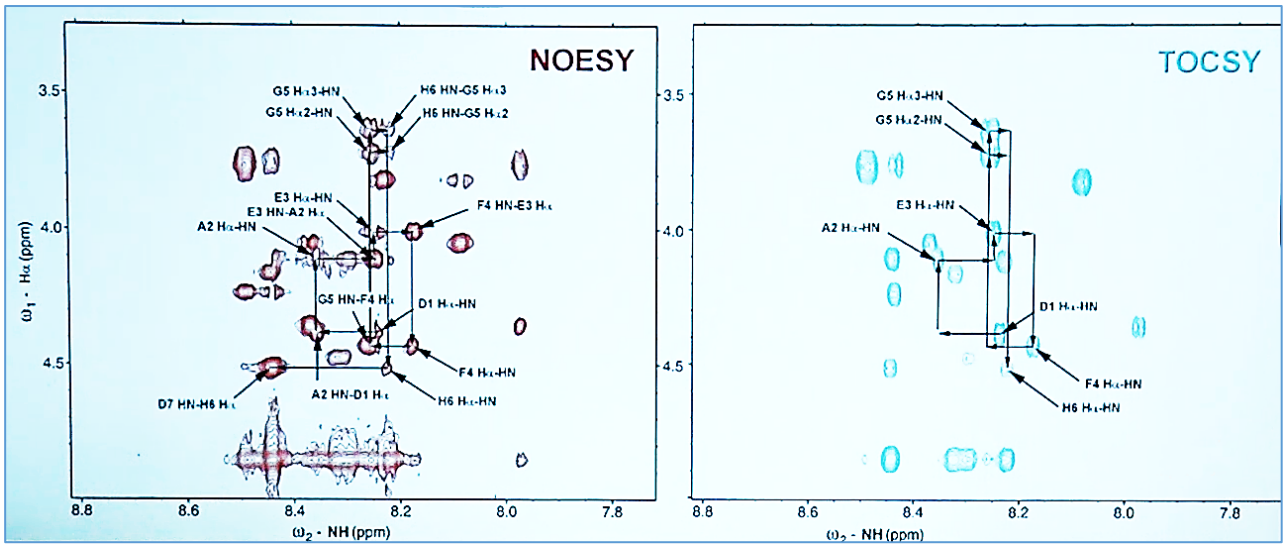


Рис. 6.11 Исследование модельного полипептида методом последовательного отнесения сигналов боковой цепи

Стратегии отнесения сигналов в спектрах ЯМР белков

Вариант 1. Исследуемый полипептид имеет массу менее 5 кДа. В этом случае его можно исследовать без предварительного мечения изотопами ^{13}C, ^{15}N, использовать только 2D спектры ЯМР COSY, TOCSY, NOESY

Вариант 2. Полипептид массой более 5 кДа, менее 12 кДа. Можно исследовать полипептид, меченный изотопом ^{15}N и использовать спектры ЯМР ^{15}N-HSQC-TOCSY, ^{15}N-HSQC- NOESY, HNHA, HNHB

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Методы гетероядерной корреляции

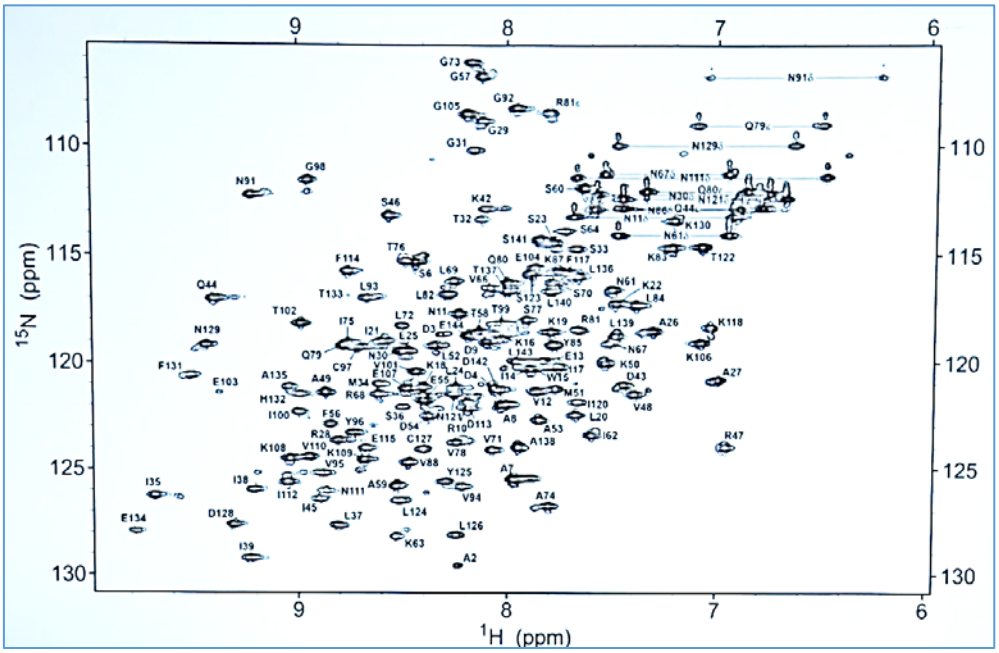


Рис. 6.12 Спектр корреляции ядер N-домена фактора терминации трансляции человека eRF1.

В 1989 году вышла статья за авторством Эда Бакса, Анжелы Гроненберг и Мариуса Клора о преодолении проблемы наложения сигналов для отнесения протонного спектра больших белков путем использования трехмерной ЯМР. В качестве третьего измерения предположили использовать гетероядра.

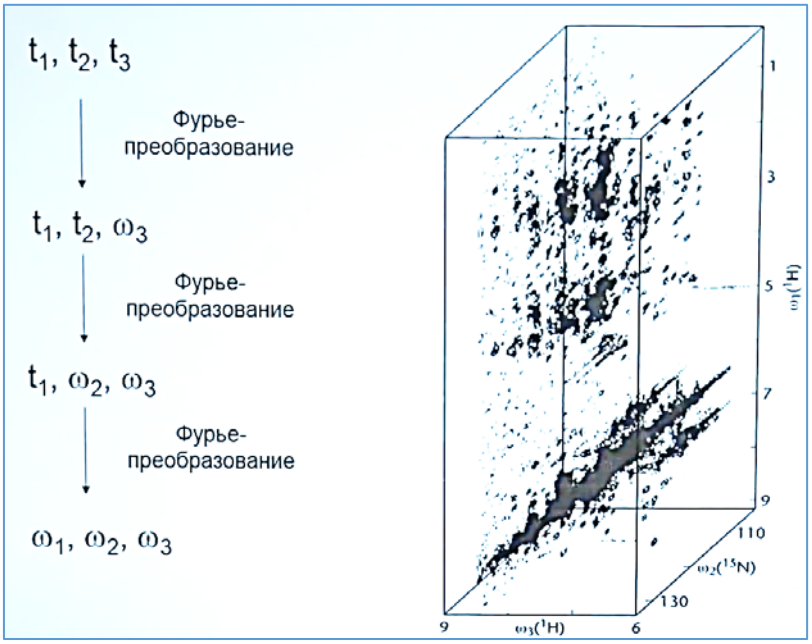


Рис. 6.13 Введение третьего измерения – 3D спектроскопия ЯМР

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Метод последовательного отнесения сигналов с использованием 3D спектроскопии ЯМР

1. Отнесение сигналов внутри спиновой систему каждого аминокислотного остатка - ^{15}N-HSQC-TOCSY

2. Попарное сочленение двух аминокислотных остатков по белковой цепи (последовательное отнесение) - ^{15}N-HSQC- NOESY

Вариант 3. Белок массой от 10 до 25 кДа. Необходимо исследовать полипептид, меченный изотопами 15N и 13C, использовать серию гетероядерных 3D спектров ЯМР: HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)HC, HNCO, HN(CA)CO, ^{15}N-HSQC-TOCSY, ^{15}N-HSQC- NOESY, HNHA, HNHB, ^{13}C-HSQC-TOCSY, ^{13}C-HSQC- NOESY и ряд других спектров.

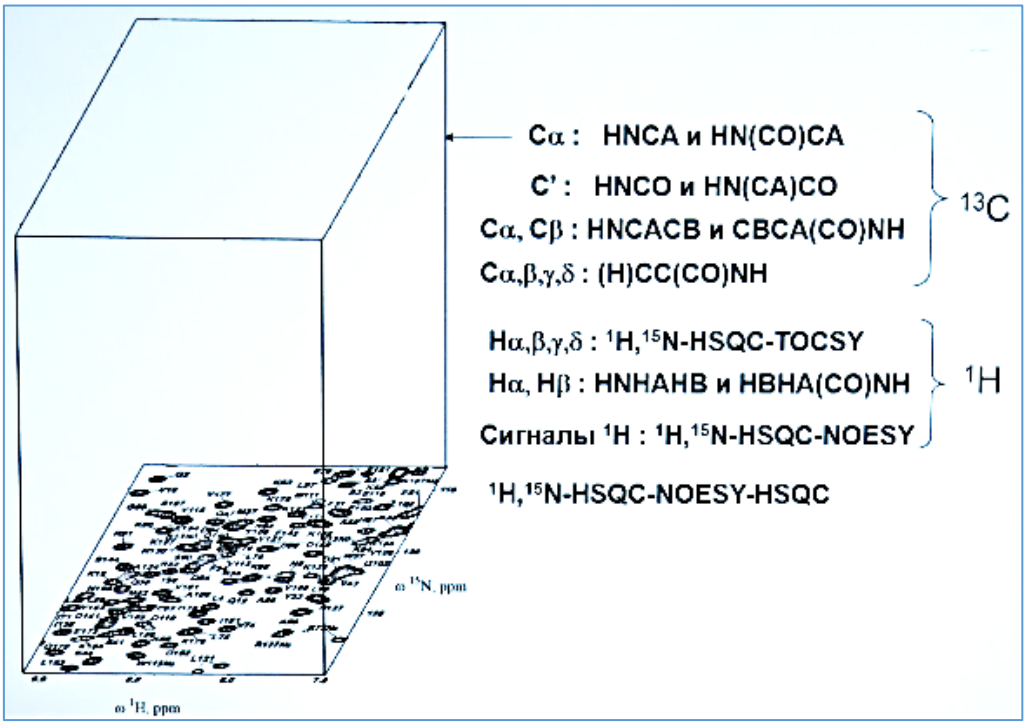


Рис. 6.14 Различные методы 3D спектроскопии ЯМР

Существуют программы автоматического отнесения, анализирующие наборы спектров и «стыкуют», проверяя корреляции.

Сделав такой анализ, мы сразу получает данные о вторичной структуре. Дело в том, что у аминокислот альфа и бета структур есть характеристические синхронные химические сдвиги относительно рандомных структур. Если в итоге получился полный консенсус, соответствующий альфа спирали, то ставим индекс химического сдвига -1, для бета структуры - +1. Если нет консенсуса, то индекс 0, что обычно соответствует рандомным нерегулярным элементам (рис. 6.15).

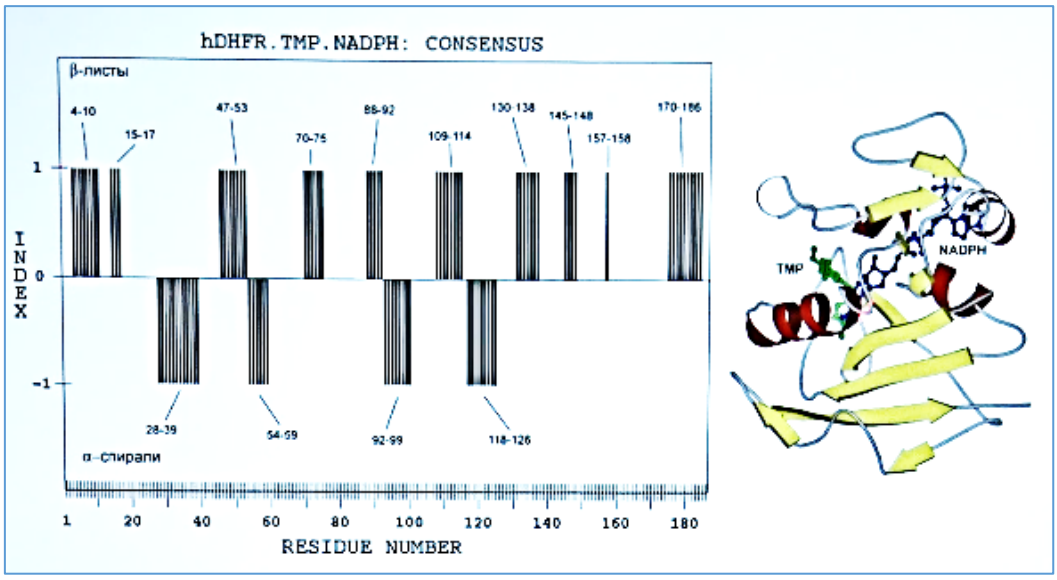


Рис.6.15 Получение вторичной структуры белка

Таблица 3. Параметры, изучаемые с помощью методов ЯМР

Наблюдаемые параметры	Получаемая из них информация
Химические сдвиги ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P	Отнесение сигналов, вторичная структура белка, НК и т.д.
Интегральные интенсивности сигналов	Количество измеряемого компонента, кинетические характеристики
Скорости обмена подвижных протонов на дейтерий	Положение водородных связей, сворачивание и разворачивание белка и НК
Константы спин-спинового взаимодействия (через химическую связь)	Характеристика хим. связей (^{1}J и ^{2}J), диэдральные углы (^{3}J), водородные связи (^{2h}J и ^{3h}J)
Ядерные эффекты Оверхаузера (взаимодейств. через пространство)	Расстояния между ядрами ($^{1}H - {}^{1}H < 5A$), динамические характеристики ($^{1}H - {}^{15}N$ и т.п.)
Ширины линий, времена релаксации ядер, кросс-релаксация	Динамика, подвижность биомолекулы, конформационные переходы
Константы диполь-дипольного взаимодействия	Ориентация белковых доменов и биомолекулы в целом, динамические эффекты

Экспериментальное пределение ориентировки биомолекул относительно внешнего магнитного поля происходит следующим образом: делается измерение константы спин-спинового взаимодействия сначала просто в воде (изотропная среда), а затем в слабо анизотропной среде. Разница между этими константами обратно пропорциональна расстоянию между ядрами и углом между полем и ориентацией связи. Это важный геометрический параметр.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Делается серия из 2х экспериментов – получение in-phase спектра и anti-phase спектра, спектры складываются и вычитаются, при этом остаются два пике – положительный в одном случае, отрицательный в другом. Измеряется расстояние между этими пиками, рассчитывается константа.

Используемые анизотропные среды:

- фосфолипидные бицеллы
- раствор бактериофага Pf1
- пурпурные мембраны
- лиотропные смеси на основе спиртов и алкилполиэтидгликолей
- квадруплексы на основе d(GpG)
- механически дефеормированные полиакриламидные гели

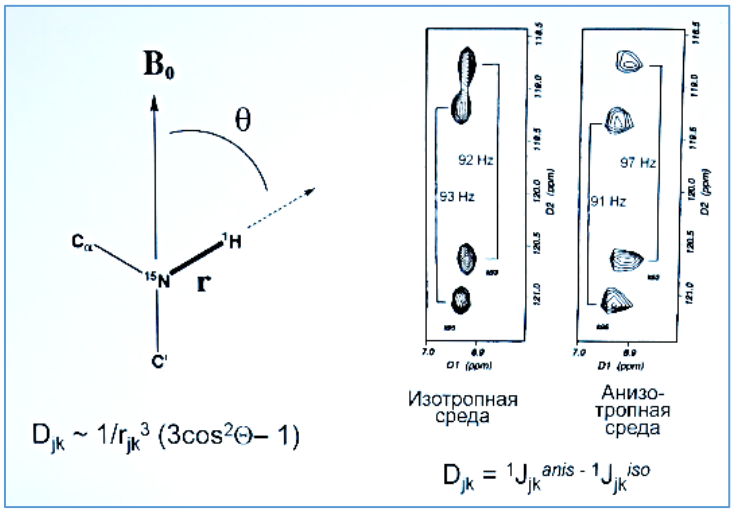


Рис. 6.16 Определение ориентации молекулы

Итого, структурные параметры ЯМР:

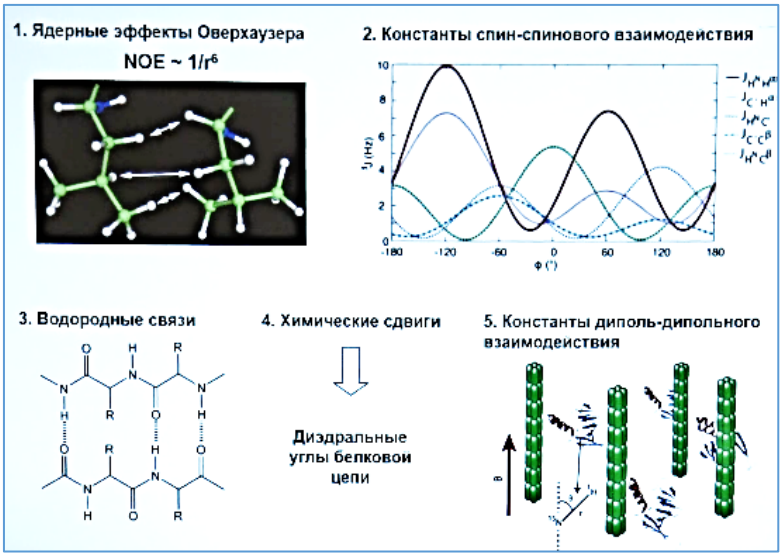


Рис. 6.17 Структурные параметры ЯМР

Методы молекулярной динамики для минимизации потенциальной энергии

В уравнениях описания молекулярной динамики кроме членов, описывающих геометрию молекулы, добавляется экспериментальный член, который включает энергию нарушений ядерных эффектов Оверхаузена, троссионных углов, водородных связей, констант диполь-дипольных взаимодействий, химических сдвигов и тд.

Например, для члена E_{NOE} мы можем установить, что он может быть равен нуля только при условии расстояние между определенными протонами 2 А. Если условия нарушается, то вводится поправка энергии. Таким образом, мы стремимся к наименьшей полной энергии системы. Эта задача трудна, т.к. очень велико количество степеней свободы в этой системе.

Силовое поле Amber:

$$E_{pot} = \sum_{b} K_2 (b - b_0)^2 + \sum_{\theta} H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\phi} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_0)]$$

(1) (2) (3)

$$+ \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum q_i q_j / \varepsilon_{ij} r_{ij} + \sum \left[\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right]$$

(4) (5) (6)

Энергия экспериментальных ограничений:

$$E_{exp} = E_{NOE} + E_{Tor} + E_{H\text{-}bond} + E_{RDC} + E_{CS} + E_{Coupl} + \dots$$

$$E_{NOE} = \Sigma E_{NOE}' \qquad E_{NOE}' = \begin{cases} 0, \text{ если расстояние между атомами соответствует эксперименту} \\ k \Delta r^2, \text{ если расстояние больше или меньше} \end{cases}$$

$$E_{total} = E_{pot} + E_{kin} + E_{exp}$$

Существует достаточное количества алгоритмов, помогающих решить такие задачи. Например, авторство одной одного из них принадлежит нобелевским лауреатам 2013 года Мартину КАрплюсу, Михаэлю Левитту, Арьеху Варшелу

Метод симулированного отжига.

Вначале мы предполагаем, что происходит очень быстрое движение системы (большая кинетическая энергия, связана с терпературой, как бы моделируем систему при очень высоких температурах). Далее начинаем постепенно охлаждать системы, и на определенно уровне она больше не может перейди на какой то более высокий барьер, а вот в сторону глобального минимума перейти все еще может. Без проведения такого

«отжига» у нас были бы слишком большие энергетические «ямы», ведущие в фиксирование в неправильных локальных минимумах (рис. 6.18).

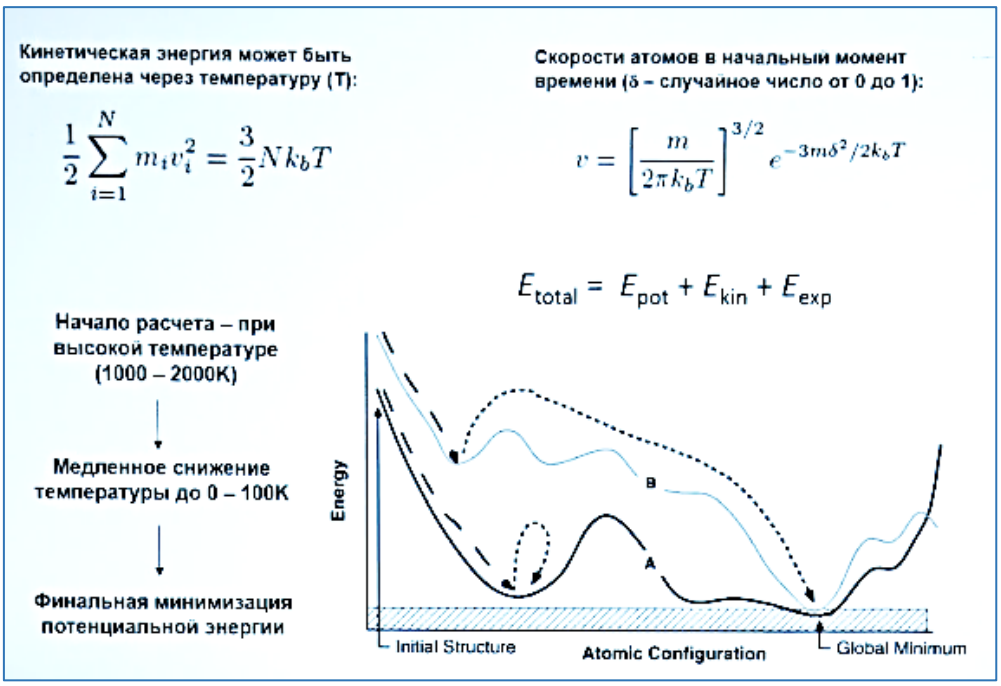


Рис. 6.18 Метод симулированного отжига.

Подведение итогов метода ЯМР

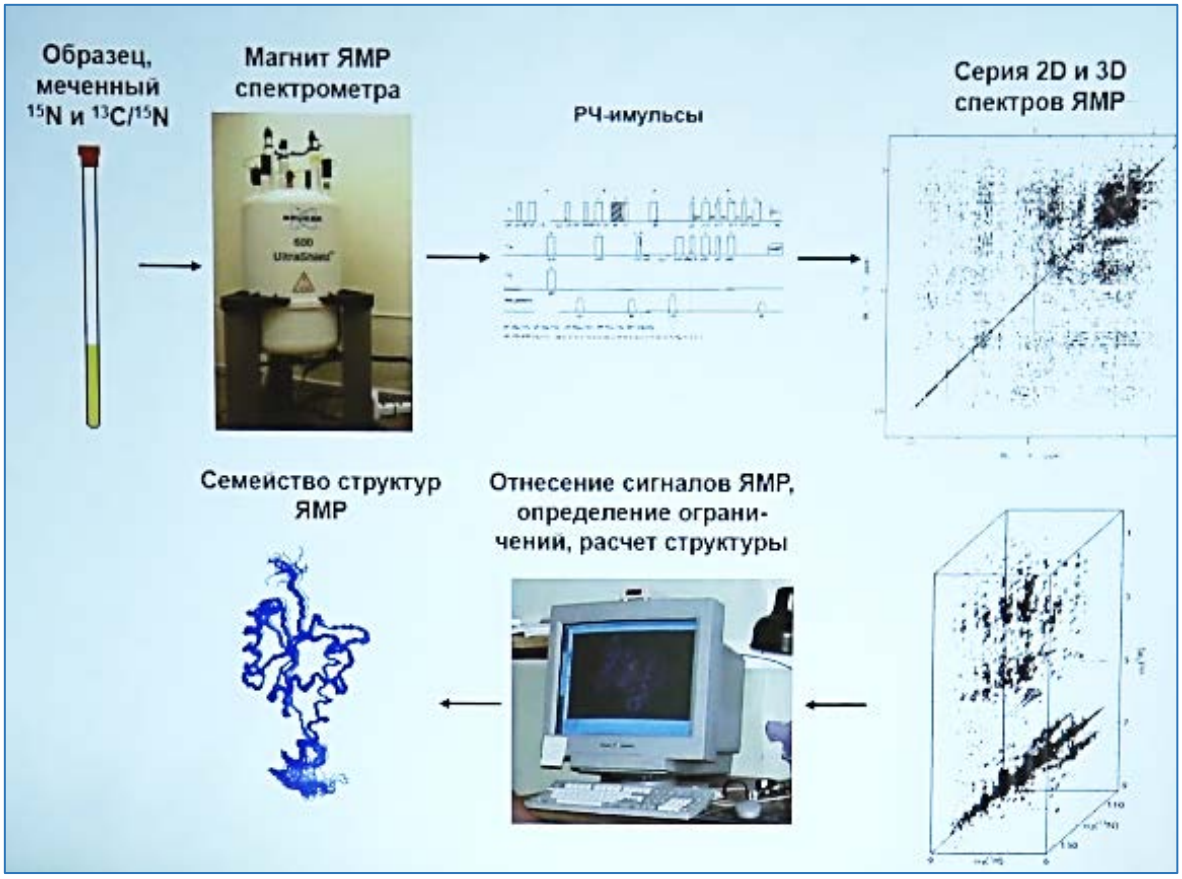


Рис. 6.19 Определение структуры белка методом ЯМР

Контроль качества рассчитанных структур ЯМР

1. Расчет среднеквадратичного отклонения координат атомов в семействе рассчитанных структур для разных белковых фрагментов цепи, где то оно будет больше, где то меньше, вычисляеется среднее. Этот параметр не надежен, т.к. белок может быть динамически подвижным.

2. Процент попадания основных углов белковой цепи в карту Рамачадрана, характеризующую наиболее благоприятные углы. Эти карты сделаны на основе статистического анализа большого количества данных о белках, полученного методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

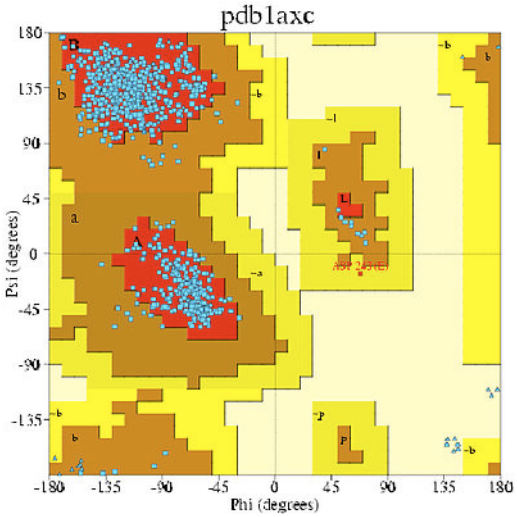


Рис. 6.20 Карта Рамачандрана

Практические аспекты определения структуры белка методом ЯМР

1. Требование к объекту:

- Масса до 30-55кДА
- Достаточная растворимость: 20мг/мл для 20КДа
- Стабильность: несколько дней при 10-30 градусах
- Высокая чистота и отсутствие агрегации
- Большие количества: 5-8 мг для 1 образца
- Высокий уровень эспрессии белка

2. Сколько уходит времени:

- Спектральные измерения: 15-30 суток
- Соотнесение сигналов ЯМР: 1-2 неделю
- Определение экспериментальных параметров из спектров ЯМР и расчет структуры: 1-15 месяцев

Сколько выходит по стоимости использовать изотопы: (стоит учитывать ежегодную инфляцию)

Изотопы	Мол.масса белка	Цена 1 л среды М9
^{15}N	5-15 кДа	~50 USD
$^{15}N/^{13}C$	10-25 кДа	~700 USD
$^{2}H/^{15}N/^{13}C$	20-55 кДа	~1400 USD

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 7

К объектам для ЯМР исследований предъявляются определенные требования, такие как ограничения в молекулярной массе, количество вещества для образца, достаточная растворимость, высокая чистота и отсутствие агрегации. Каким образом получают объекты исследования?

Получение объектов исследования для ЯМР

Есть два ключевых способа. До недавнего времени доминирующим был подход - биосинтез меченого белка в культурах клеток. Отличие от стандартного клонирования белка заключается в том, что используется минимальное среда: один источник азота - (как правило сульфат аммония и хлорид аммония, меченый соответственно изотопом ^{15}N), если требуется обогащение по углероду, то источник углерода тоже должен быть один (как правило глюкоза или глицерин, меченный стабильным изотопом ^{13}C). Всё остальное более-менее стандартно: выращивается культура клеток, в которые встроены плазмиды, несущие ген требуемого белка. После наработки некоторого количество белка совершают лизис клеток, используют различные методы выделения, гистидиновый таг и тд.

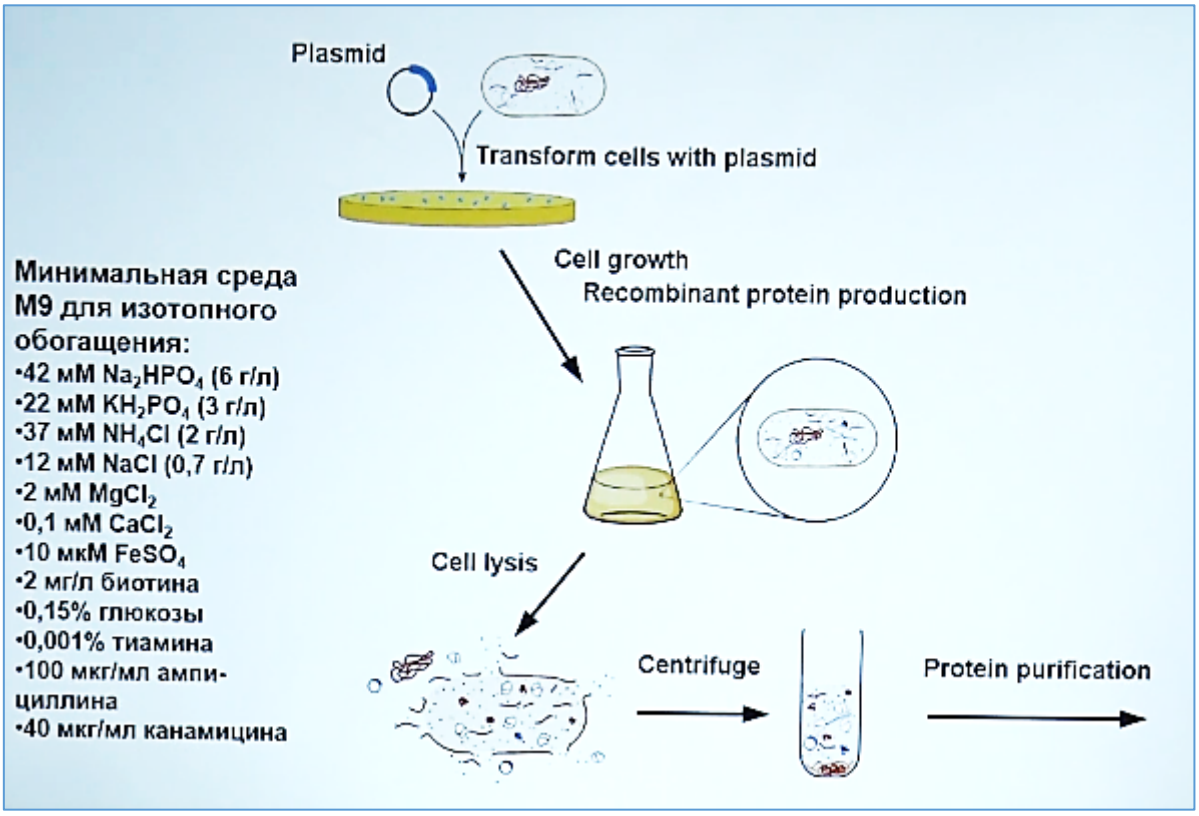


Рис. 7.1 Биосинтез меченого белка в культурах клеток

Всё большую популярность набирает метод бесклеточного синтеза, когда делают экстракт тех биомолекул, которые требуются для бесклеточного синтеза. Соответственно после лизиса их экстрагируют, и далее в довольно простых условиях

(как правило это условия диализа) происходит биосинтез в пробирке. Для этого добавляют весь пул требуемых аминокислот, если необходимо - меченых.

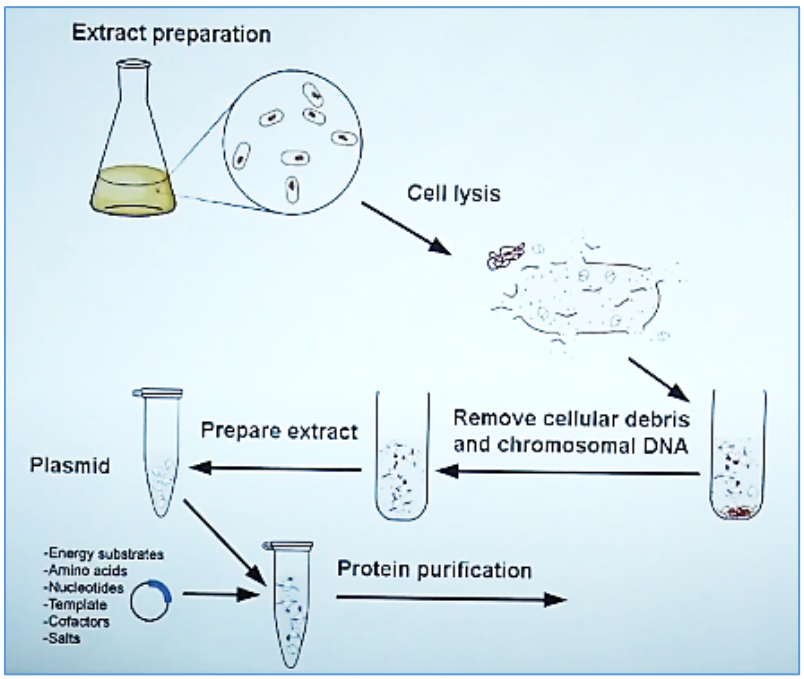


Рис. 7.2 Метод бесклеточного синтеза

Исследование нуклеиновых кислот методом ЯМР

Нуклеиновые кислоты - это, как и белки, регулярные биополимеры. В отличие от белков они состоят не из 20 различных “кирпичиков”, а всего лишь из четырех. Существуют определенные проблемы и подходы для их решения в изучении НК с помощью ЯМР. В ДНК мы рассматриваем дезоксирибонуклеиновые кислоты, рибозный цикл, связи с фосфатами, пуриновые и пиримидиновые гетероциклы. Есть прежде всего два важных конформационных состояния протонов - син и анти (рис. 7.3). Для син состояния происходит сближение двух протонов, это можно детектировать на спектре. Анти конформация как правило наиболее распространённая, и все это можно измерять в нуклеиновых, как правило меченых, кислоах с помощью спин-спиновых и тд констант взаимодействия.

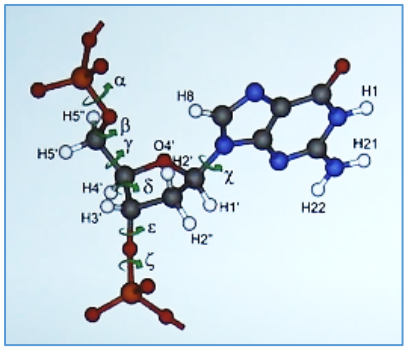


Рис. 7.3 Изучаемые повороты и конформации молекулы

Второй пункт для изучения это конформации рибозного цикла. Есть два два ключевых состояния: north-type и south-type (рис. 7.4). В одном случае сближены протоны в третьем и четвёртом положениях, в другом они находятся в транс расположении, что и влияет на эффект Оверхаузера. На самом деле конформационных состояний рибозногоо цикла может быть больше, чем эти два, и все описываются циклом псевдовращения рибозного цикла (как выходят из плоскости каждый из фрагментов фрагментов углеродного остова рибозного цикла), также существуют формулы, связывающие угол псевдовращения с реальными диэдральными углами, которые описывают состояние рибозного цикла. С этими параметрами тесно связаны наблюдаемые константы спин-спинового взаимодействия. Таким образом информация ЯМР нуклеиновых кислот приносит довольно большой пласт структурных данных.

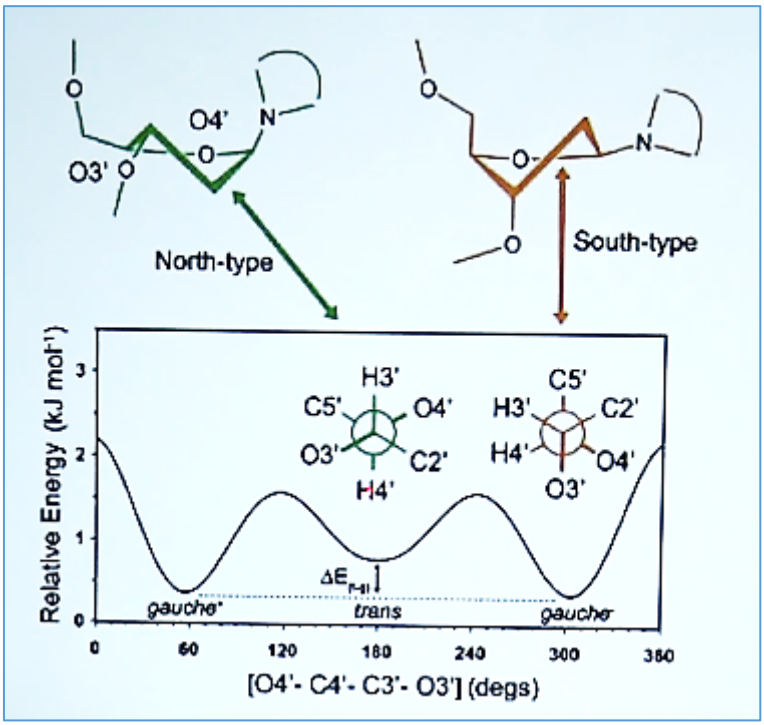


Рис. 7.4 Конформации рибозного цикла

Измеряется первичный спектр в H2O (можно детектировать не только сигналы от CH протонов, связанных с углеродом, но и протоны иминные), в областях этого спектра можно увидеть области уотсон-криковского диапазона (химических сдвигов именно протонов двойной спирали), фрагмент квадруплексов, ай- мотив, то есть можем грубо оценить строение без знаний о конкретном местонахождении (рис. 7.5). Чтобы сделать отнесение и расчет структуры немеченых стабильными изотопами фрагментов ДНК, нужно сделать уже ряд спектров:

1. 1D спектр в H2O – детектирование иминных протонов
2. 2D спектры NOESY и ROESY в H2O
3. 2D спектры NOESY и DQF-COSY для отнесения сигналов ДНК
4. 2D спектры ^{13}C-^{1}H HSQC в D2O на естественном содержании изотопа ^{13}C (чтобы

минимизировать посторонние сигналы и максимально увеличить чувствительность CH)
5. Спектр гетероядерной корреляции ^{31}P-^{1}H HSQC в D2O.

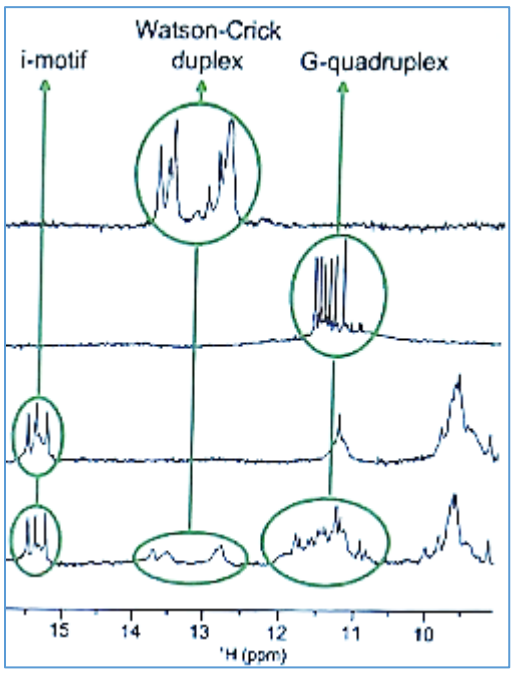


Рис. 7.5 Основные мотивы ДНК на спектре

Как осуществляется отнесение?

Подход приблизительно такой же, как и в белках: необходимо сделать последовательное отнесение. В белках основой информации является амидный протон (он с одной стороны близок ко всем протоном внутри данного аминокислотного остатка, это видно на спектрах COESY и TOCSY, они просто связаны за счет корреляции, и этот протон близок к предыдущим аминокислотным остаткам). При изучении ДНК используют ароматические протоны CH. Они с одной стороны близки к основным протонам рибозного цикла, с другой стороны хорошо отстоят от всего остального. Можно наблюдать кросспики между протонами ароматическими i-го остатка и i-1-го остатка рибозного фрагмента, таким образом последовательно можно соединять сигналы на спектре. Этот метод работает, пока все протоны находятся в анти конформации. При повороте протона на 180 градусов последовательное соотнесение становится невозможным, т.к. протоны «не дотягиваются» друг до друга.

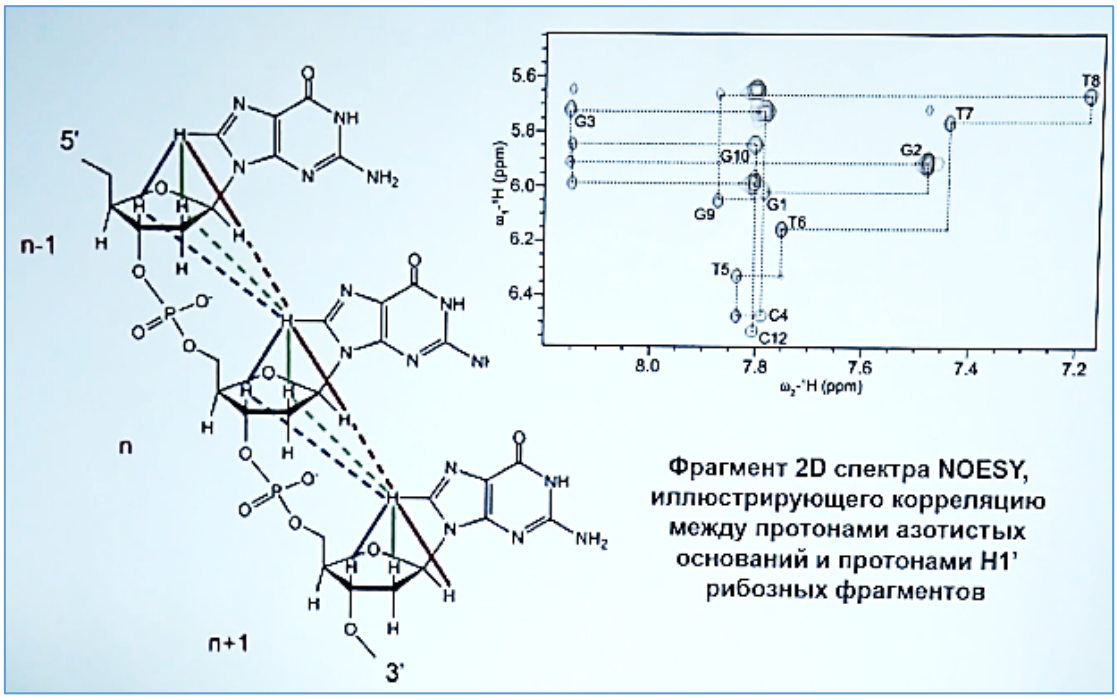


Рис. 7.6 Корреляция протонов азостистого основания и рибозного фрагмента

Если есть средства и возможности сделать мечение изотопами, то анализировать спектр будет проще (рис.7.7). Для последующего сочленения все равно необходим NOESY или дополнительное мечение углеродом.

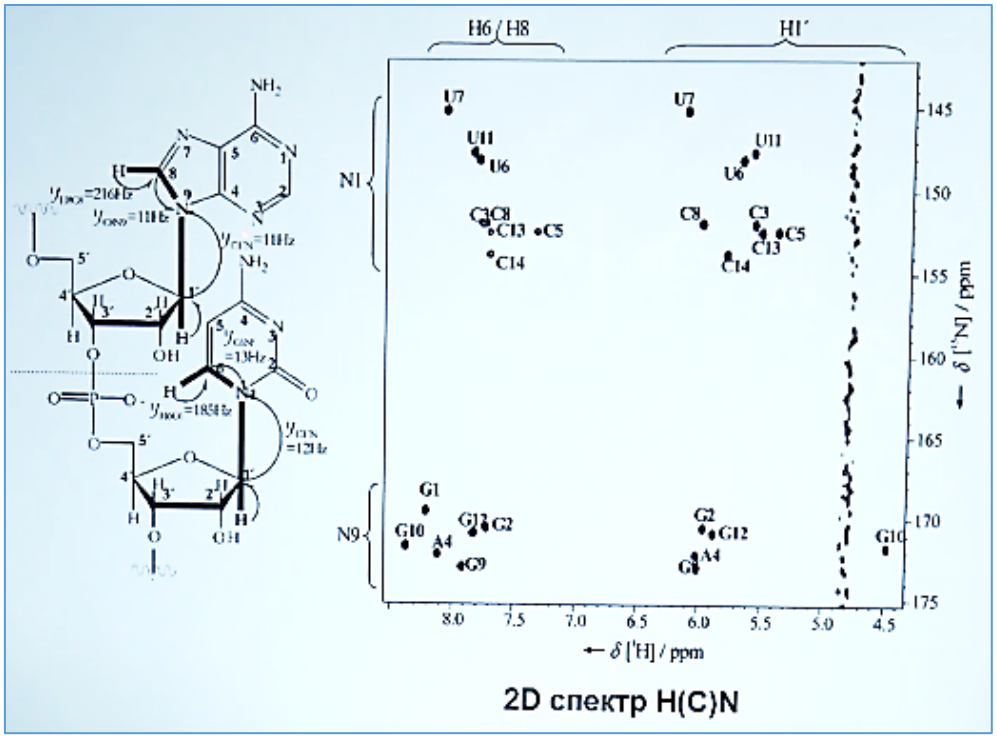


Рис. 7.7 Мечение 15 N

(C) означает, что C не наблюдается, но через него передается намагниченность между H и N.

Если добавлены углеродные изотопы, то появляется возможность строгого отнесения. Углероды находятся и в рибозном цикле, и в ароматическом гетероосновании. Последовательно сочленять углероды можно используя еще и корреляцию на фосфор, который будет связывать iй и i-1й остаток. Соответственно, есть целый ряд различных экспериментов, позволяющих использовать такую методику.

Структурно РНК более разнообразны, но мечение происходит проще – через транскрипцию в культуре меченых клеток с изотопным обогащением. На данный момент большая часть структур ДНК и РНК исследована именно методом ЯМР, т.к. не все структуры поддаются кристаллизации для метода рентгеноструктурного анализа.

ЯМР в изучении динамических свойств биомолекул

ЯМР является единственным методом изучения диамики молекул с разрешением до отдельных атомов. С помощью ЯМР изучаются локальные быстрые флуктуации, вращения боковых цепей, protein tumbling (скорость вращения белковой глобулы в растворе), фолдинг белка, связывание лигандов, высокоамплитудное открытие/закрытие белковой глобулы, катализ относительно субстрата.

Почти все диапазоны таскать вот этих временных и частотных процессов охватываются разными ЯМР. В наносекундой-пикосекундной области измеряется время релаксации; real-time ЯМР - это наблюдение за изменением интенсивности во времени, например обмен протонов на дейтерий в реальном времени. Область микросекунд когда-то была просто запретной, но сейчас появились возможности, основанные на анализе констант диполь-дипольного взаимодействия (измерения в анизотропных средах).

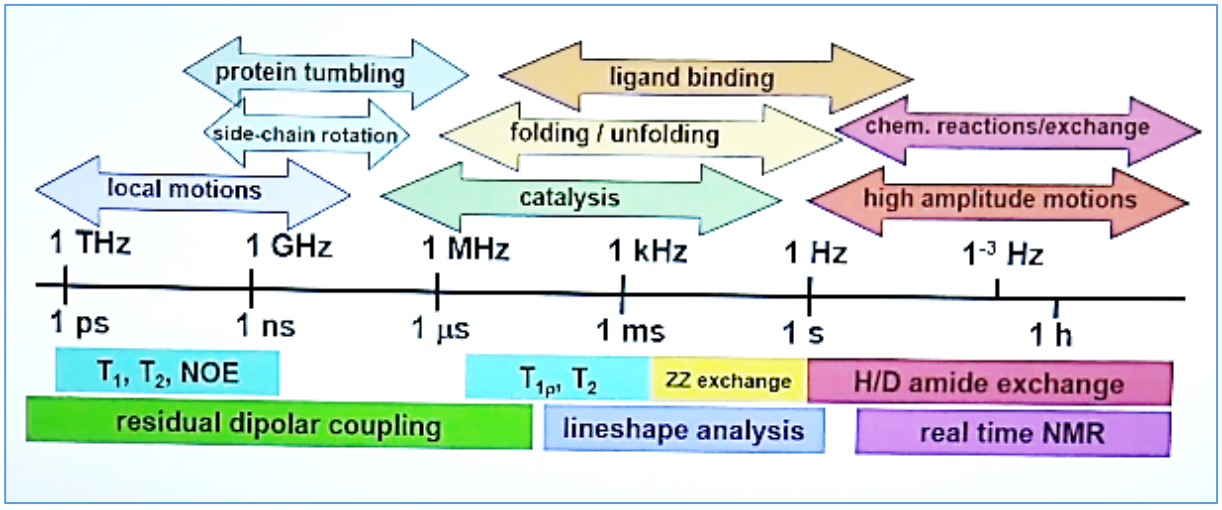


Рис. 7.8 Явления, изучаемые с помощью ЯМР и их характерные времена

Релаксация ядерной намагниченности и ее динамическая природа

Время релаксации – это время возврата намагниченности от состояния выведенности из равновесия при приложении магнитного поля

T1 – время продольной (спин-решеточной) релаксации (по оси z), сек
T2 – время поперечной (спин-спиновой) релаксации (плоскость xy), сек

R1 и **R2** – скорости релаксации, с-1

$Ri=Ti^{-1}$

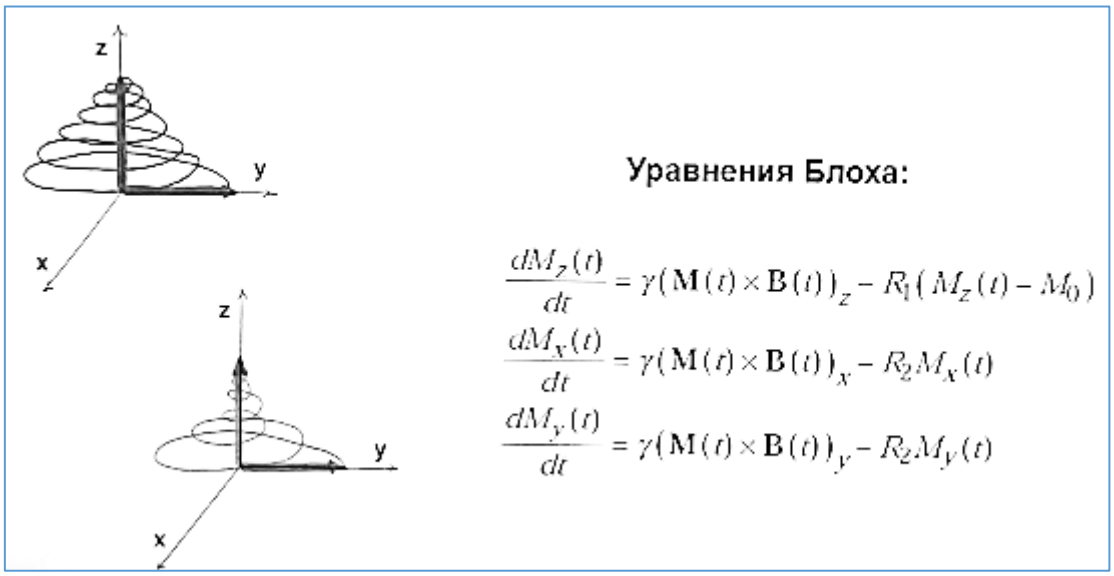


Рис. 7.9 Релаксация ядерной намагниченности

Продольная релаксация обусловлена осцилляцией магнитного поля в поперечной плоскости (xy)
Поперечная релаксация обусловлена осцилляцией (или неоднородностью) магнитного поля в продольном направлении (z)

Магнитуду осицлляции магнитного поля можно охарактеризовать функцией автокорреляции:

$$G(\tau) = \overline{f(t)f(t+\tau)}$$

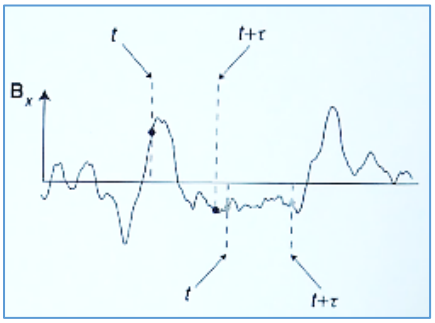


Рис. 7.10 Время t и тау

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Функция корреляции для изотропной вращательной диффузии сферической частицы:

$$G(\tau) = \frac{1}{5} e^{(-\tau/\tau_c)}$$

где Tc – время корреляции вращательного движения

Время корреляции Tc приблизительно соответствует времени, за которое сферическая частица совершает поворот на 1 радиан, описывается уравнением Стокса-Энштейна:

$$\tau_C = {}^{4\pi\eta r^3}/_{3kT}$$

η- вязкость раствора
r – радиус молекулы

Если существуют в глобуле относительо независимые внутренние флукцтуации, то они описываются уравнением:

$$G(t) = \frac{1}{5}\left[S^2 e^{-t/\tau_C} + (1-S^2)e^{-t/\tau_i}\right]$$

Механизмы релаксации

1. Диполь-дипольное взаимодействие.

Одно ядро наводит магнитное поле на другом, и эта величина наведения будет различаться различных положений диполя во внешнем магнитном поле.

$$d = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\hbar\gamma_I\gamma_S}{r_{IS}^3}\left(3\cos^2\theta - 1\right)$$

2. Анизотропия химического сдвига

Например, в бензольном кольце за счет тока электронов наводится локальное магнитное поле. Это локальное магнитное поле будет по разному складываться и вычитаться с внешним магнитным полем в зависимости от ориентации кольца.

$$c = \frac{\gamma_S B_0 \Delta\sigma_S}{\sqrt{3}}\left(3\cos^2\theta - 1\right)$$

3. Скалярное спин-спиновое взаимодействие

4. Квадрупольное взаимодействие

5. Химический (конформационный) обмен

Считается, что диполь-дипольное взаимодействие и анизотропия химического сдвига описывают 95-98% точности релаксационной характеристики. Если принимать во внимание только их, то можно получить аналитические формулы, связывающие

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

скорости продольной и поперечной релаксации с так называемой функцией спектральной плотности.

$$R_1 = 3AJ(\omega_N) + AJ(\omega_H - \omega_N) + 6AJ(\omega_H + \omega_N) + BJ(\omega_N)$$

$$R_2 = 2AJ(0) + \frac{3A}{2}J(\omega_N) + \frac{A}{2}J(\omega_H - \omega_N) + 3AJ(\omega_H) + 3AJ(\omega_H + \omega_N) + \frac{2B}{3}J(0) + \frac{B}{2}J(\omega_N)$$

$$\sigma_{NH} = -AJ(\omega_H - \omega_N) + 6AJ(\omega_H + \omega_N)$$

DD term: $A = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_N^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{4r_{NH}^6}$ CSA term: $B = \frac{\Delta\sigma_N^2 B_0^2 \gamma_N^2}{3}$.

$$\sigma_{NH} = \frac{\gamma_N}{\gamma_H} R_1^N (NOE - 1) \implies NOE = 1 + \sigma_{NH} \frac{1}{R_1^N} \frac{\gamma_N}{\gamma_H}$$

Посчитать функции спектральной плотности невозможно без какой нибудь модели-приближения.
В самой простой модели - модели **Липари-Забо** - белок рассматривается в виде сферической глобулы, где каждая связь NH имеет определенную степень внутренней свободы.

$$J(\omega) = \frac{S^2 \tau_R}{1 + (\omega\tau_R)^2} + \frac{(1 - S^2)\tau_e'}{1 + (\omega\tau_e')^2},$$

Модель с двумя типами движений с разными частотами:

$$J(\omega) = \frac{S_f^2 S_s^2 \tau_R}{1 + (\omega\tau_R)^2} + \frac{(1 - S_f^2)\tau_f'}{1 + (\omega\tau_f')^2} + \frac{S_f^2(1 - S_s^2)\tau_s'}{1 + (\omega\tau_s')^2}$$

Изучение быстрых движений белковой цепи

Релаксационные параметры могут быть измерены при различных частотах. Если мы все это проанализировали и сравнили с расчетными параметрами моделей, то далее можем получить относительные амплитуды движения боковой цепи в быстрых временах (от нано- до пико-секунд)

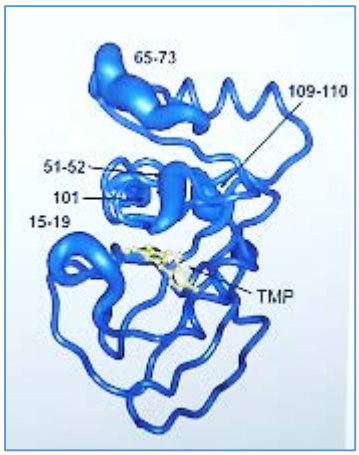


Рис. 7.11 Относительные амплитуды, рассчитанные по ЯМР. Видно, что бета-листовой остов белка практически полностью жесткий, а петли имеют высокую амплитуду движений.

Химический обмен и определение его скорости

В миллисекундной шкале времени можно по ширинам определить скорость конформационных переходов. Допустим, есть состояние А и В, им соотвествуют свои химические сдвиги. В зависимости от скорости обмена между ними в спектрах ЯМР будут либо соответствующие линии, либо, при возрастании скорости обмена, линии сначала уширяются и сливаются в одну, а затем сужаются (рис. 7.12).

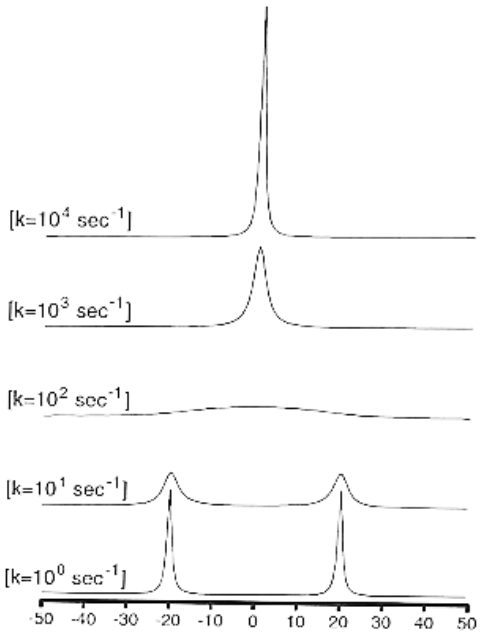


Рис. 7.12 Линии химического обмена в зависимости от характерных времен

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Измерение скоростей обмена H->D в исследовании медленных движений белка

Экспериментально исследование проводится так: берется лиофилизированный образец, расстворяется в D2O, максимально быстро переносится в магнит, измеряются двумерные спектры. Протоны обмениваются в разной скоростью: один быстро, другие медленнее, т.к. защищены водородными связями, окружающими плотными структурами. Так, протоны в бета структурах будут обмениваться медленее, в петлях – быстрее.

ЯМР в изучении внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий

- прямое детектирование водородных связей
- определение состояния ионизации заряженных аминокислотных остатков
- определение гидрофобных кластеров
- определение констант диссоциации лигандов
- определение стехиометрии взаимодействия белок-лиганд, белок-металл и тд
- картирование центров связывания лигандов
- изучение взаимодействий белок-белок, белок-РНК, белок-ДНК
- методы ЯМР скрининга для определения лигандов, связывающихся с биомакромолекулами

Метод молекулярных фрагментов – вместо поиска одного соединения из множества, которое будет связываться с мишенью, производят скрининг отдельных фрагментов, связывающихся с мишенью, и затем их содениняют в одну молекулу (например, метод SAR-by-NMR).

Ограничения, характерные для методов ЯМР-скрининга

- требуются большие кол-ва белка (до 2-10 мг на 1 образец)
- хорошая растворимость белка, получение концентрации от 100мкМ до 1 мМ
- в указанных концентрациях не должно быть агрегации и денатурации белка
- белок должен быть мечен изотопами ^{15}N или ^{13}C
- размеры исследуемых белков мишеней ограничены (30 кДа, в редких случаях до 60 кДА)

Методы ЯМР скрининга, основанные на наблюдении сигналов лиганда

Напомним, что мишень обладает медленным Броуновским движением, быстрой релаксацией сигналов ЯМР, отрицательными значениями эффекта ОВерхаузера, медленной трансляционной диффузией. Свойства лиганда противположны. Когда мишень связывается с лигандом, то свойства лиганда начинают повторять свойства мишени.

- Saturation Transfer Difference (STD) - ЯМР-метод, основан на измерение разностных спектров лиганда при переносе насыщения (наблюдаются резонансы только тех лигандов, которые способны связаться с белком).

- методы, основанные на соединениях с ядрами ^{19}F, например – FAXS , 12-FABS

Методы ЯМР скрининга позволяют начать с простой структуры, и путем контроля ее усложнения искать наиболее афинные соединения, что выгодно отличает этот способ от высокопроизводительного скрининга, где необходимо перебирать большое количество соединений.

Методы изотопного мечения биомолекул

- дейстерирование
- селективное мечение
- мечение фрагментов белка
- stereo array isotope labeling

Методы, основанные на детектировании ядер ^{13}C и ^{15}N позволяют изучать быстрый обмен NH протонов, неупорядоченные белки, крайней крупные и парамагнитные белки.
Методы ЯМР твердого тела позволяют преодолеть окраничение по массе исследуемой молекулы.

Методы ускорения экспериментов ЯМР

Для получения 3D спектра хорошего качества необходимо накопий матрицу спектров, каждый из которых повторен несколько раз для уменьшения шума. Это занимает много времени – около 100 часов. Для 4D – 218 часов и тд.

Существуют подходы для ускорения получения готовых спектров:

- быстрые импульсные последовательности – SOFAST-HMQC, BEST
- накопление не полной матрицы, а «разряженной» из определенных точек
- метод реконструкции проекций – проведение всего нескольких двумерных экспериментов и дальнейшая реконструкция
- проведение двумерного эксперимента всего с 1 сканом (разделение на слои по градиенту, проведение быстрого скана каждого слоя, реконструкция)

Лекция 8

Основы электронной микроскопии. Просвечивающая электронная микроскопия

Человеческий глаз не приспособлен к различению крайне отдаленных объектов и малых объектов. Одна из причин заключается в том, что, при приближении предмета менее чем на 20 см к глазу, циллиарная мышца полностью расслабляется и не позволяет навести фокус. В среднем человеческий глаз обладает способностью разделять две точки, находящиеся на 0,255 мм друг от друга, предельное разрешение для удаленного объекта – 1’ (1 минута дуги).

Для преодоления этих ограничений были создали различные приборы. Первым был световой микроскоп, сконструированный Робертом Гуком. Эрнст Аббе разработал теорию микроскопа, которая однозначно определила, что позволяет микроскопу работать максимально эффективно. Он показал, что оптический прибор формирует изображение точечного источника света (источника, расстояние до которого бесконечно велико по сравнению с его размерами, и который излучает свет равномерно во всех направлениях) в виде пятна конечных размеров. А если два пятна имеют конечные размеры, то могут и сливаться. Результатом его исследований стала формула, связывающая геометрические параметры системы (состоящей из объектива микроскопа и наблюдаемого объекта) с предельным разрешением.

$$\mathbf{NA = n*sina}$$

NA – числовая аппература, равна половине угла, под которым виден объектив из точки положения объекта, когда микроскоп сфокусирован на этот объект
n – показатель преломления среды объекта и передней линии объектива

Итого, **формула предельного разрешения**:

$$\mathbf{\delta = 0{,}61\lambda/NA} \quad \text{, нм}$$

Разрешающая сила:

$$\mathbf{R = 1/\delta}$$

Эта формула показала, что для оптического микроскопа существует предельное разрешение (242 нм), превзойти которое не представляется возможным – проблема дифракционного предела.

С конца 19 века человечество хорошо познакомилось с электронами. Электроны, как и фотоны, обладают волновыми свойствами (так, например, если направить поток электронов на две щели, то можно наблюдать интерференцию).

Формула де Бройля позволяют определить эквивалентную длину волны электрона. Так, для электрона в электронном микроскопе с ускоряющим напряжением 100000 В длина волны составить 3,7*10-3 нм. Такая длина волны позволит разрешать объекты, находящиеся гораздо ближе друг от друга.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Также мы знаем, что, если через катушку провода в виде соленоида пропустить ток, то создается магнитное поле, которое действует на пролетающие электроны так же, как и стеклянная линза действует на проходящий через нее свет. Учитывая возможность генерирования электронных пучков, можно собрать микроскоп, использующий электроны в качестве излучения, несущего информацию об объекте.

Сравнение светового и электронного микроскопов

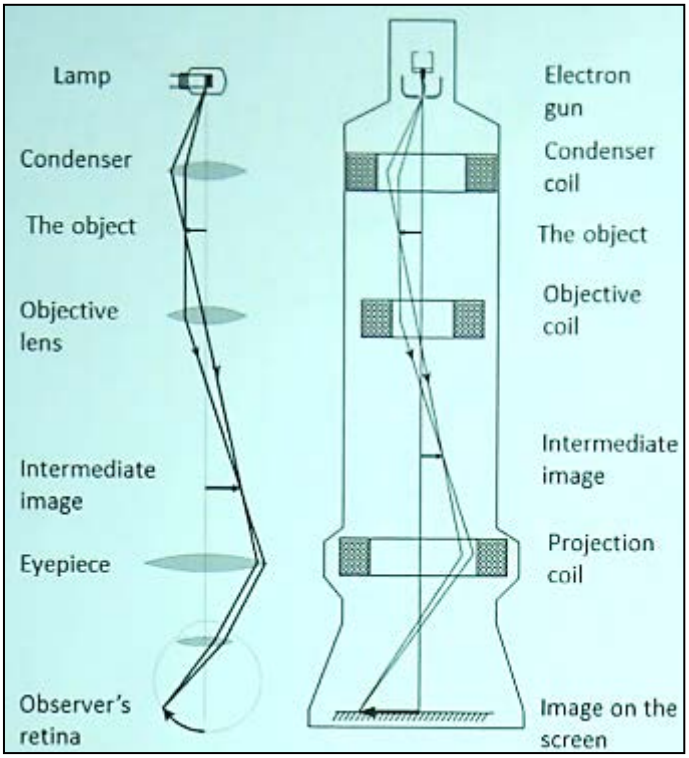


Рис. 8.1 Схемы светового и электронного микроскопов

Как в световом микроскопе, так и в электронном есть источник излучения – источник света и источник электронов. Есть система линз – стеклянные линзы для светового и магнитные для электронного. Принцип формирования изображения одинаков – за счет объектива (на уровне объектива применяется формула Аббе – получается промежуточное изображение, в котором реализована разрешающая способность объектива). В световом микроскопе итоговое изображение воспринимает глаз. В электронном для этого необходимы устройства либо для превращения энергии падающих электронов в энергию света, либо для непосредственного регистрирования детектором.

Также стоит учитывать, сто электроны в воздухе не распространяются, поэтому вся система электронного микроскопа заключена в воздухонепроницаемый корпус (колонну), внутри которого создаются условия довольно глубокого вакуума. Вакуум накладывает ограничения - объект, наблюдаемый в микроскопе, должен быть устойчив к вакууму.

Какое разрешение может предоставить электронный микроскоп?

Формулы все те же:

$$NA = n*\sin a$$
$$\delta = 0{,}61\lambda/NA$$

При этом n=1 для электронов в вакууме
a = 0,01 радиан для магнитной линзы

И для не очень мощного электронного микроскопа с напряжением поля в 100 кВ и NA=0,01 предельное разрешение будет составлять, теоретически $\delta = 0{,}61*4*10^{-3}/0{,}01=0{,}244$ нм, что в 1000 раз больше, чем в световом микроскопе.

Учитывая релятивистскую теорию, можно сказать, что предельное разрешение будет составлять 0,22 нм.

Взаимодействие электрона и материи

Воздействие падающего на объект ускоренного пучка луча электронов приводит к появлению целого набора новых излучений несущих информацию об образце. Если образец позволяет, то часть луча пройдет сквозь образец без взаимодействия. Часть электронов претерпит упругое рассеяние, т.е. изменят направление, не изменив энергию. Часть претерпит неупругое рассеяние (отдаст часть энергии). Падающий луч может приводить к ионизации атомов в составе образца, что будет приводить к эмиссии вторичных электронов. Также возможно обратное рассеяние (как упругое, но не прошедшее через образец). И, в конце концов, часть энергии электронов, так или иначе «застрявшей» в образце, будет испущена в виде квантов электромагнитного излучения, по большей части в рентгеновском диапазоне.

Для биологических исследований наибольший интерес представляют прошедший луч и упругое рассеяние, происходящее на ядрах атомов. Чем больше заряд ядра, которое оказывает воздействие, тем эффективнее происходит рассеяние.

Биологическая материя состоит из довольно легких атомов – азот, кислород, углерод, водород, и свойством хорошо рассеивать электроны ядра этих элементов не обладают.

Образец, использующийся в электронной микроскопии должен быть тонким – его толщина не должна превышать величину свободного пробега электронов в данном материале. Для электронов с энергией, соответствующей напряжению 100 кВв биологической материи длина свободного пробега равна примерно 100 нм.

Тяжелые элементы

В отсутствии образца линза объектива собирает проходящие сквозь нее электроны, они сходятся в определенной точке пространства и затем снова расходятся. В образце есть элементы с разной атомной массой, распределенные неравномерно, и если поместить образец перед линзой объектива, то электроны будут рассеиваться сильнее на участках с более тяжелыми элементами. Эти упруго рассеянные электроны будут задержаны диафрагмой объектива. Электроны, прошедшие через образец без взаимодействия или с минимальным углом отклонения достигнут детектора. Чем больше электронов рассеял участок образца, тем более темным он будет на итоговом изображении. Но такое

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

рассеяние обеспечивают только по-настоящему тяжелые элементы: осмий, свинец, уран.

Деструктивное влияние электронов

Электроны несут достаточно большую энергию.
1 рад = 100 эрг/г = 0,01 Дж/кг
Для получения даже невысоко контрастного изображения в электронном микроскопе необходимо поглощение образцом около 5*10^9 рад. Для биологической материи поглощение такого количества энергии (с сопутствующим нагреванием) губительно.

Эффекты облучения:
- разрушение молекул и образование свободных радикалов
- сублимация компонентов
- перегруппировки химических связей
- нагревание
- контаминация

Дополнительные инструменты, использующиеся в электронной микроскопии

Для фиксации образца в микроскопе используется так называемая сетка – металлическое кольцо, центр которого заполнен системой пересекающихся перекладин. Диаметр составляет 3 мм, количества и форма ячеек варьируется, сетка снизу покрывается тонкой полимерной пленкой подложкой (углеродные, графеновые, полиформальдегидные). Уже много десятилетий это стандартный носитель для образца.

Подготовка образцов

Метод негативного контрастирования – это самый простой способ, позволяет наблюдать, к примеру, вирусные частицы, белковые комплекса (e.g. рибосомы), наночастицы. Суть метода крайне проста: суспензию с объектом исследования наносят на сетку, затем смывают, при этом на ней остается некоторое количество частиц. Поверх наносится контрастирующая смесь, содержащая тяжелые металлы: раствор фосфовольфрамовой кислоты, уранилацетат и тд. Жидкость выдерживается ~ 30 сек. В итоге частицы за счет капиллярных сил остаются окруженными тонким слоем осадка этого материала.

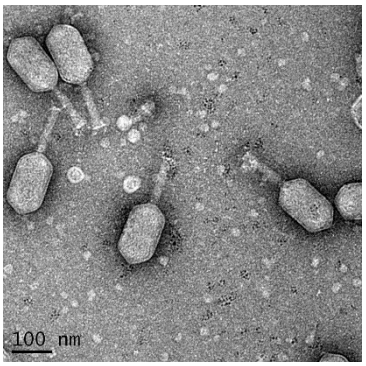


Рис. 8.2 Электронная микроскопия бактериофага. Негативное контрастирование

Plunge-freezing (криоэлектронная микроскопия) - более современный метод, подходит для исследования не только силуэта объекта, но и его 3D структуры. Если заморозить небольшое количество воды со скоростью порядка 10 000 градусов/сек, то она перейдет в твердое состояние, минуя образование кристаллов льда. Для таких процедур используется специальная сетка, ячейки которой также заполнены ячеистой пленкой. Суспензия частиц наносится на такую сетку, в малых ячейках остаются нанокапли жидкости с объектом, а затем окунается в жидкий этан при температуре жидкого азота (теплоемкость этана больше, он не успевает закипеть при контакте). Полученное в ходе электронной микроскопии изображение подвергается компьютерному анализу, контрастируется, на основе полученных изображений составляются модели объекта (single particle analysis).

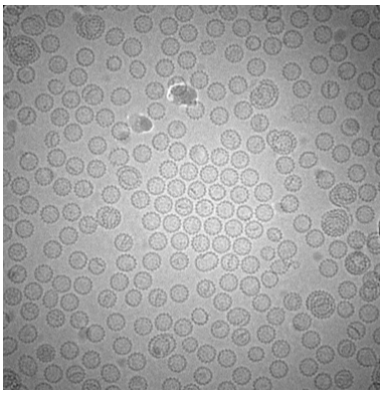


Рис. 8.3 Криоэлектронная микроскопия.

Как исследовать крупные объекты?

При исследовании крупных объектов (но толщина не превышает 100 нм), таких как клетки, необходимо учитывать следующее:

1. *Хрупкость и сложность системы*: стабилизация субклеточных структур в состоянии, близком к нативному, и устойчивость к повреждению пучком электронов достигаются путем фиксации - химического сшивания или/и быстрым замораживанием.
2. *Плохое рассеяние электронов*: достигается лучшее рассеяние электронов и, следовательно, более высокий контраст, достигается путем насыщения образцов тяжелыми элементами - осмием, свинцом, ураном и др.
3. *Содержание воды*: мягкое обезвоживание путем постепенного замещения воды органическими растворителями. Последующее удаление жидкой фазы путем сушки в критической точке или встраивания полимера.
4. *Большой размер образца*: приготовление ультратонких срезов упрощается путем встраивания полимером пластика/смолы, которые также обеспечивает дополнительную механическую и радиационную устойчивость.

Приготовление ультратонких срезов

После заливания образца смолой необходимо приготовить срезы. Из образца с большим количеством клеток готовится «пирамидка» ~1 мм, которая нарезается с помощью микротома. Микротом подает образец вперед с заданным шагом на нож

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

(оптимально нож – алмазный). Срезы изготавливаются сериями, что позволяет выделять позднее пространственную структуру исследуемого объекта.

Изучение небиологических образцов. Дифракция электронов на кристаллических структурах

Метод очень похож на рентгеноструктурный анализ, но используется другой вид излучения. В режиме дифракции электронов любой кристалл дает картину рефлексов. Предварительно откалибровав прибор и имея масштабы сравнения, можно измерять расстояние между атомами плоскостей в кристалле. Опять же, изучаемые кристаллы должны быть устойчивы к воздействию пучка электронов.

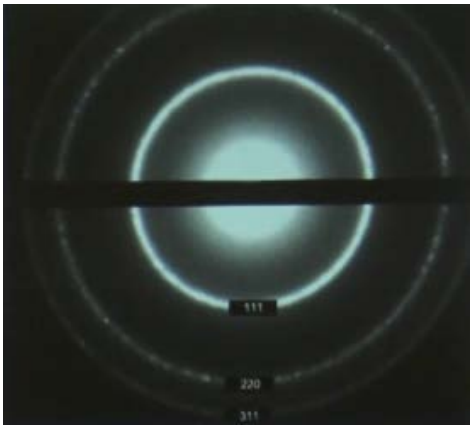


Рис. 8.4 Каждое кольцо сформировано рассеянием электронов на одной из характерных плоскостей в кристалле алмаза.

EELS – Electron Energy Loss Spectroscopy

Электронная микроскопия, помимо анализа структуры, позволяет изучать состав образца. Неупругое рассеяние электронов подчиняется законам квантовой механики, соответственно можно составить атлас потери энергии электронами при взаимодействии с атомами. Фильтруя прошедшие через образец электроны по энергии, можно выделять из общего потока те электроны, которые потерял определенную часть энергии в соответствии с взаимодействием с определенным элементом. Для этого в микроскопах используются современные монохроматические электронные пушки с полевой эмиссией, которые испускают когерентные электроны с одинаковой энергией.

Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия позволяет с высокой разрешающей способностью исследовать поверхность образца. У этого микроскопа также есть электронная пушка, колонна, «объектив» (последняя линза). Суть в том, что луч фокусируется в точке как можно меньшего размера, а сборка магнитных катушек позволяет сканировать этим лучом образец, линию за линией. С помощью различных детекторов происходит слежение за разными видами вторичных излучений (обратное рассеяние, вторичные электроны, рентгеновские фотоны и др.). Особое требование к изучаемым этим методом образцам – образец должен быть электропроводящим, иначе

под воздействием луча электронов он зарядится и будет отталкивать бомбардирующие его электроны, снижая разрешающую способность прибора.

Падающий электронный луч формирует на образце грушевидный объем, в котором происходит взаимодействие с электронами. Из разных частей этого объема исходят разные типы излучений. Из верхней части «груши» происходят вторичные электроны – результат ударной ионизации, когда падающий электрон, передавая свою энергию атому, вызывает отрыв собственного электрона атома, энергия которого мала. Это приводит к двум следствиям: 1) если вторичные электроны образовались слишком глубоко в объеме, то у них не хватит энергии преодолеть этот объем, так что зарегистрировать можно только электроны с поверхности, 2) их малая скорость позволяет поставить ловушку, поместив в камеру с образцом положительный заряд, который притягивает к себе только эти электроны и не влияет на другие излучения. Различные участки поверхности в зависимости от угла наклона открывают большую или меньшую площадь «зоны вторичных электронов» - с плоской поверхности их выходит мало, с наклонной – больше.

Обратно рассеянные электроны несут информацию не о рельефе поверхности, а, в первую очередь, о заряде ядер (т.е. примерную информацию о составе объекта). Т.к. их энергия равна энергии падающих электронов, то они могут происходить из более глубоких зон образца, чем вторичные электроны. Детектор этих электронов надет непосредственно на источник луча, представляет собой полупроводниковый фотодиод, отвечающий рождением заряда в ответ на попадание в него электрона со стороны образца.

Подготовка образцов:
- необходима фиксация биологических образцов (в глицеральдегиде и т.д.)
- контрастирование и стабилизация мембран с пероксидом осмия
- обезвоживание
- сушка в критической точке
- напыление металлов для придания поверхности электропроводности, стабилизации образца, более эффективной генерации вторичных электронов

Критическая точка – это физическое состояние вещества, при котором комбинация температуры и давления такая, при которой нет различия между жидкостью и газом. При удалении жидкости в критической точке не создается поверхностного натяжения, которое деформирует структуру образца. Для воды координаты: +374С и 22мПа. Для CO2: +31С и 7,4 мПа. Образец помещается в этиловый спирт (замещение воды), затем спирт замещается на ацетон, с ацетоном и углекислым газом происходит сушка в критической точке.

Для напыления **металла** используются платина и платиновые сплавы, золото, т.к. они химически инертны, хорошо проводят ток, хорошо генерируют вторичные электроны. Используется устройство, в котором в разрешенной атмосфере аргона образец заряжается положительно, платиновая пластина отрицательно, ионы газа ударяются в мишень и выбивают из нее атомы металла, которые оседают на образце слоем в 3-5 нм.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

High-throughput high-resolution 3d imaging с использованием SEM. Внутри электронного микроскопа можно установить прибор, автоматически снимающий с блока с образцом слои материала, что позволяет наблюдать за постоянно обнажающимися слоями поверхности посредством регистрации обратно рассеянных электронов.

Также в электронном микроскопе возможна установка прибора, генерирующего направленный луч галия, позволяющего взаимодействовать с образцом в крайне малых масштабах (создание отметок и наносистем гравировкой, сварку, отложение металлов или кремния для работы с малыми микросхемами, снимание тонких слоев с образца).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 9

Сканирующая зондовая микроскопия. Основы метода

И в оптической, и в электронной микроскопии для получения микроскопического эффекта используется принцип фокусировки/дефокусировки объекта. Излучение фокусируется на небольшую часть объекта, оно взаимодействует каким-то образом с объектом, после взаимодействия излучение дефокусируется за большой экран для регистрации результатов взаимодействия. В оптической микроскопии излучение – это поток фотонов, фокусировка происходит за счет оптических линз, в электронной – электроны и магнитные линзы.

В отличии от этих двух видов микроскопии, зондовая микроскопия основана не на фокусировке изображения, а на ближнепольных взаимодействиях (есть изучаемая поверхность, сканирующий зонд в виде тонкой иглы, и между концом зонда и поверхностью существуют взаимодействия, быстро убывающие с расстоянием). Сканирующая зондовая микроскопия – метод исследования поверхности. Для изучения нанообъектов, диспергированных в растворе, необходимо предварительно иммобилизовать их на гладкой поверхности.

Типы взаимодействий и методы

Сканирующая туннельная микроскопия (СТМ).

Тип взаимодействия – туннелирование электронов. Представим, что есть два проводника с разностью потенциалов, которые сближаются. Ток между ними начнет течь чуть раньше, чем произойдет непосредственное соприкосновение проводников. Электроны – это квантовые объекты, не подчиняющиеся законом микроскопического мира, и вероятность существования электрона в любой точке пространства описывается волновой функцией. Соответственно, если расстояние между проводниками небольшое, то существует ненулевая вероятность перехода электронов из одного проводника в другой. В случае сканирующей микроскопии одним проводником является исследуемая поверхность, вторым – игла зонда с крайне малым радиусом закругления.

$$I_{тун} \sim \exp(-r * \sqrt{\varphi - eV})$$

Порядок силы тока – от пиконьютонов до нанонью тонов. Образец должен быть электропроводящим.

Сканирующая силовая микроскопия (ССМ)

Также называется атомно-силовой микроскопией (АСМ). Тип взаимодействия – ван-дер-ваальсовы силы. Два атома на больших расстояниях притягиваются, на малых – отталкиваются. Если приблизить зонд на очень малое расстояние к поверхности, то между кончиком зонда и поверхностью начнут действовать универсальные ван-дер-ваальсовы силы либо притяжения, либо отталкивания. Сила взаимодействия:

$F = 1 / r^n$, десятки пН – десятки нН. Нет ограничения по свойствам проводимости поверхностей.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

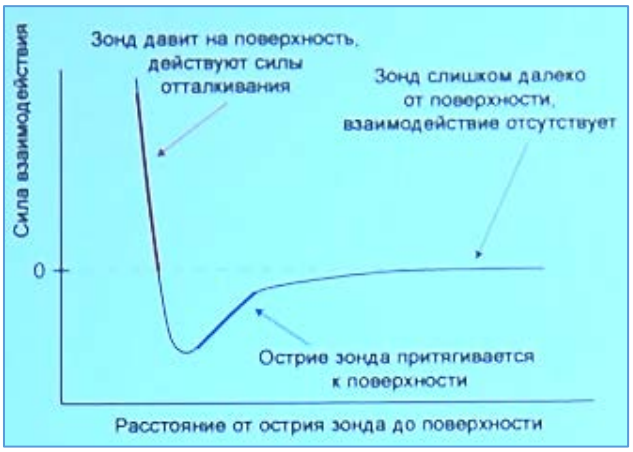


Рис. 9.1 Сила взаимодействия поверхности с зондом в зависимости от расстояния.

Для регистрации взаимодействия поверхности и зонда служит система кантилевера и лазера-фотодетектора. Зонд закреплен на очень гибкой балке, способной изгибаться под воздействием малых сил, зачастую покрывающейся золотом для лучшей отражающей способности. В «расслабленном» состоянии балки отраженный луч лазера попадает ровно в центр 4х секционного детектора. Если на кончик кантилевера действуют силы отталкивания, то балка изгибается вверх, отраженный луч попадает в верхние четверти детектора. Обратная ситуация для сил притяжения. В случае действия сил на кантилевер сбоку балка скручивается, луч будет уходить вправо или влево на детекторе.

Сканирующая ближнепольная оптическая микроскопия (СБОМ)

Тип взаимодействий – затухающие волны. Представим, что есть некая поверхность, снизу от которой показатель преломления выше, сверху – ниже, и мы пропускаем луч, который будет отражаться от этой поверхности. Есть некий критический угол по отношении к нормали, выше которого будет наблюдаться эффект полного внутреннего отражения. Из уравнений Максвелла следует, что напряженность электрического непрерывна. Грубо говоря, в точке за границей раздела фаз электрическое поле должно как-то продолжаться, но при этом мы не наблюдаем прохождения какого-либо света в сторону среды с меньшим показателем преломления. И действительно, за границей раздела фаз существует ненулевая напряженность электрического поля – формируются так называемые затухающие волны, которые бегут вдоль поверхности, и напряженность в этих волнах убывает экспоненциально с расстоянием.

Теперь возьмем оптоволокно с кварцевым сердечником и оболочкой с меньшим показателем преломления. Если с одной стороны волокна запустить свет, то с другой стороны торец будет светиться. Если торец срезать так, чтобы получилось отверстие меньшее, чем длина волны, свет из такого волокна выходить перестанет. У окончания этого волокна с другой стороны образца будет существовать область ненулевой напряженности поля, и получающимися затухающими волнами возможно зондировать поверхность образца.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

СБОМ «преодолевает» дифракционный предел, существующий в дальнепольной оптической микроскопии. Предельное разрешение составляет ~λ/12, т.е. для λ=480 нм составит 40 нм.

Вернемся к сканирующей зондовой микроскопии. Зонд должен позиционироваться относительно образца с очень высокой точностью (зазор должен составлять порядка долей нанометра). Также зонд необходимо перемещать, и шаговые моторы для этого непригодны. Итого в микроскопии используется пьезотрубка.

Пьезотрубка

Пьезоматериалы – это материалы, в которых проявляются прямой и обратный пьезоэффекты.

Прямой эффект: возникновение поляризации (разности потенциалов) диэлектрика при приложении деформации

Обратный пьезоэффект – деформация диэлектрика при приложении разности потенциалов (напряжения)

Исторически большое распространение получили пьезотрубки. Из пьезоматериалов создают полую трубку, напыляют на нее 7 электродов (справа, слева, спереди, сзади, сверху, снизу и внутренний электрод). Если подать на два противоположных электрода относительно внутреннего + и -, то трубка изогнется влево или вправо, вперед или назад. Подавая напряжение на торцевые электроды, можно сжимать трубку. В современных приборах пьезотрубки все чаще заменяют на три независимых пьезосканера.

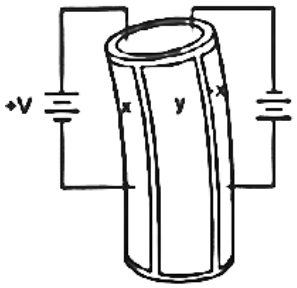


Рис. 9.2 Схема строения пьезотрубки

Итого, возможно две принципиальные схемы микроскопа: 1) есть основание с закрепленным образцом, пьезотрубка с зондом, с помощью компьютера зонд перемещается относительно образца 2) зонд закреплен неподвижно, а образец перемещается сам относительно зонда.

Режимы работы микроскопии

Любой сканирующий зондовый микроскоп способен работать в 3 разных режимах:
1. **Сканирование:** площадь поверхности образца разбивается условно на линии, каждая линия разделяется на точки, зонд снимает сигнал в каждой точке.
2. **Спектроскопия:** в выбранной точке поверхности измеряется зависимость одного параметра от другого, например, изгиб кантилевера в зависимости от высоты.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Результатом спектроскопии является кривая, которая затем обрабатывается для получения требуемой информации о выбранной точке поверхности.
3. **Литография:**

- сдвигание крупных объектов зондом
- индентирование мягкой поверхности
- население канавок на мягкие поверхности
- электрохимическая литография
- перьевая нанолитография

Режим постоянной высоты.

Представим, что кантилевер прижат к поверхности и движется вдоль нее по некоторой фиксированной плоскости XY. В этом случае можно снимать фотодетектором сигнал, который несет информацию о сгибе кантилевера, и, соответственно, о структуре поверхности. Этот режим используется редко, т.к. в наивысших точках кантилевер испытывает слишком большой изгиб, а в низших точках расстояние между ним и плоскостью может превышать дистанцию для сил взаимодействия.

Режим системы обратной связи

В системе обратной связи напряжение кантилевера поддерживается на одинаковом уровне, либо он совершает движения вверх-вниз, либо образец.

Резюме основ СЗМ

1. В отличие от методов оптической и электронной микроскопии, использующих принцип фокусировки-дефокусировки излучения, основой СЗМ является использование короткодействующих взаимодействий между острым углом зонда и поверхностью образца

2. Используемые взаимодействия: СТМ – туннельный ток, ССМ – ван-дер-Ваальсовы и др. силы, СБОМ – затухающие волны.

3. Позиционирование осуществляется при помощи пьезоэлементов.

4. Дополнительные блоки прибора: антивибрационная система, 3 моторизованных микрометрических винта, оптическая система, вакуумная установка, система нагрева-охлаждения, жидкостные ячейки.

5. Режимы использования прибора: сканирование, спектроскопия, литография

6. Режимы сканирования: режим постоянной высоты и режим постоянной интенсивности взаимодействия с использованием петли обратной связи.

Атомное разрешение СТМ

Учитывая формулу туннельного тока

$$I_{тун} \sim \exp(-r * \sqrt{\varphi - eV})$$

можно понять, что более 90% туннельного тока течет через крайний атом иглы (сильная зависимость от расстояния). Это значит, что даже с помощью несовершенной иглы с концом неправильной формы, но на котором есть 1 выступающий атом, возможно получать атомарное разрешение при туннельной микроскопии.

В силовой микроскопии зависимость менее резкая:

$$F = 1 / r^n$$

Поэтому в формировании сигнала играет роль вся нижняя часть кантилевера и соответственно некая площадка на поверхности образца.

Искажающие факторы СЗМ

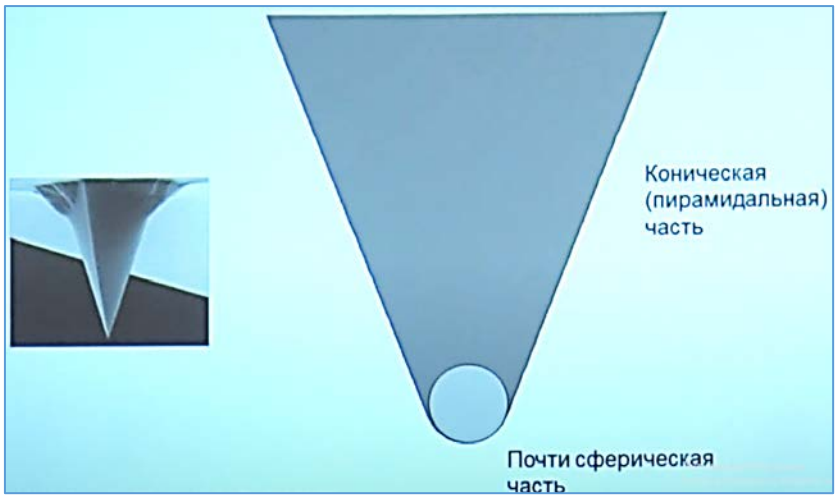


Рис. 9.3 Условное строение кантилевера

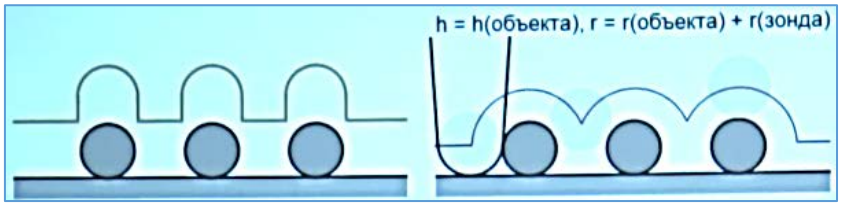


Рис. 9.4 Взаимодействие зонда и объекта, размеры которого меньше или сравнимы с его размерами. Слева – идеально тонкий зонд, справа – обычный зонд.

Все структуры рельефа будут измерены как более широкие, чем они есть на самом деле.

Если размер объектов значительно превышает радиус сферической части зонда, то уширение будет за счет конической или пирамидальной части зонда.

Итого, какие зонды можно использовать для различных типов измерения? Рутинные измерения: пирамидально-конические кремниевые иглы (r~6-10 нм) Крупные объекты, ступеньки: вискеры (крайне тонкие кристаллы на конце кремниевой

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

иглы) (l=1 мкм, r~ 6-10 нм, но крайне малый конический угол) ССМ высокого разрешения: вискеры Клинова (r~1-2 нм, l=100 нм)

В процессе сканирования мягкие биологические объекты обратимо или необратимо деформируются, что приводит к занижению реальной высоты объектов.

Не смотря на то, что пьезоматериалы – это удобный материалы для измерения расстояния с точностью до единиц и долей ангстрема, у них есть и недостатки. Первым недостатком является нелинейность свойств пьезокерамики и гистерезис (рис. 9.5)

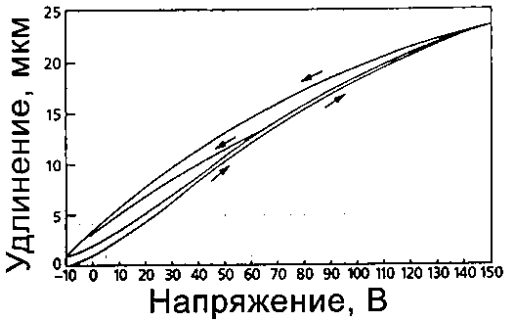


Рис. 9.5 Зависимость удлинения пьезоматериала от напряжения.

Во-вторых, пьезокерамика имеет свойство ползучести. При подаче напряжения за пьезоматериал он расширяется не одномоментно, а в течение некоторого времени.

Техническое решение: датчики перемещений по всем 3м осям + 2 быстрые обратные связи по X и У, а также уменьшение скорости передвижения зонда.

Артефакты

Искажениями называются объекты, которые на самом деле присутствуют на поверхности, но его геометрические параметры искажены. Артефакты – это появление в изображении объектов, которых нет на реальной поверхности.

Самый частый артефакт сканирующей микроскопии – это **эффект двойной вершины** зонда. На конце зонда может образовать «вторая вершина» за счет скола или прилипания материала с образца, в итоге зонд касается объекта два раза двумя вершинами. Таких вершин может быть больше, чем две (на изображении появляются «дубли» объектов)

Возможно появление артефактов за счет **сдвигания объектов** или их частей зондом по поверхности (на изображении объекты как будто обрываются)

Также артефакты появляются из-за **неоптимизированных условий** проведения микроскопии:

1) неоптимальные параметры работы обратной связи и скорости сканирования
2) неверный выбор рабочего уровня нажатия на зонд
3) неверный выбор жесткости кантилевера
4) сильное влияние электростатических сил

Неискаженные количественные характеристики, получаемые из СЗМ:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

- Число объектов на единицу площади
- Расстояние между объектами (период решетки для периодических структур)
- Контурная длина протяженных объектов

Качественные характеристики:

- Взаимное расположение частей объектов
- При сходном характере объектов возможно качественное сравнение степеней заполнения поверхности

Резюме искажающих факторов СЗМ:

1. В туннельной микроскопии окончания игл, как правило, имеют сложную форму. Но при сканировании ровных поверхностей с объектами порядка нескольких ангстрем легко достигается атомарное разрешение за счет то, что «работает» последний атом иглы.

2. В силовой микроскопии с поверхностью взаимодействует все окончание зонда. Из-за этого появляются уширение латеральных размеров объектов, связанное для мелких объектов с нижней сферической частью иглы, а для крупных – со средней конической или пирамидальной.

3. Для мелких объектов необходимо подбирать зонд с как можно меньшим радиусом закругления, для высоких объектов и ступеней — с как можно меньшим коническим углом.

4. Из-за давления зонда на образец высота «мягких» объектов в АСМ всегда занижена.

5. Возможно наличие искажений линейных размеров, связанных с несовершенством пьезоматериалов (нелинейности, гистерезиса, крипа). Эти искажения устраняются в современных приборах путем использования датчиков перемещений по 3 осям.

6. Наиболее частым артефактом в СЗМ является эффект двойной вершины зонда. При обнаружении таких артефактов зонд необходимо заменить.

7. В силовой микроскопии возможен сдвиг объектов зондом.

8. Несмотря на наличие большого кол-ва искажающих факторов, можно выделить ряд свойств, которые являются неискаженными.

Как осуществляется режим постоянной силы взаимодействия в туннельной микроскопии?

Игла подводится к поверхности до тех пор, пока не начинает течь ненулевой туннельный ток, это ток фиксируется и за счет системы обратной связи поддерживается постоянным при движении зонда по поверхности.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Атомное разрешение СТМ

Если есть подходящая частично заполненная или незаполненная орбиталь в образце, то возможно электроны зонда могут туннелировать на образец. Если же таких орбиталей нет, то электронам зонда недостаточно энергии для перехода в образец на орбиталь с более высоким уровнем энергии туннельный ток резко упадет. Т.е. СТМ «видит» не атомы, а наличие или отсутствие подходящих по энергии электронных состояний. Возможна и обратная ситуации при изменении направления поляризации – с заполненных орбиталей образца электроны туннелируют на металл иглы, с незаполненных – нет. Так, например, при исследовании графита видны не все атомы, а только каждый второй, т.к. у каждого второго атома нет подходящих электронных состояний для туннелирования.

С помощью СТМ можно изучать двумерные фазовые переходы или химические реакции на поверхности.

Туннельная спектроскопия

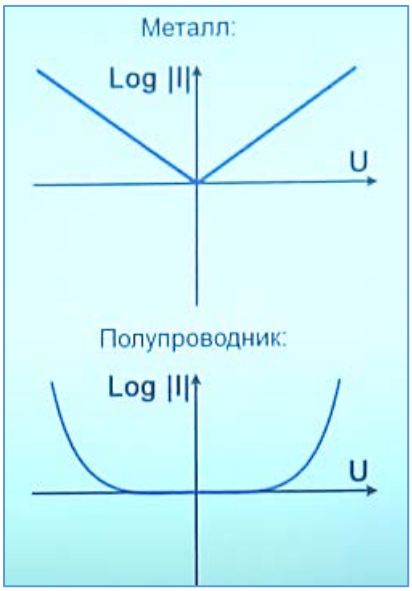


Рис. 9.6 Зависимость тока для металла и полупроводника от разницы потенциалов

Для молекул, лежащих на поверхности:

Полностью заполненная молекулярная орбиталь не пригодна для туннелирования (рис 9.7, участок 1). Если увеличить разность потенциалов, тем самым сдвинув электронные уровни молекулы чуть вниз, появится путь туннелирования с зонда на свободную молекулярную орбиталь – ток возрастет, при дальнейшем увеличении разности потенциалов будут появляться новые свободные уровни для туннелирования (рис. 7, участок 2). Если уменьшать разность потенциалов, но в определенной момент электрону будут туннелировать уже в заполненной молекулярной орбитали молекулы на зонд (рис. 7, участок 3). Таким образом можно исследовать электронные уровни молекулы.

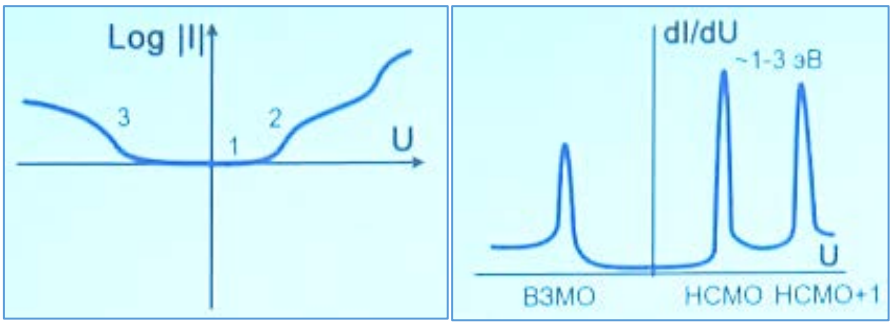


Рис. 9.7 Слева – зависимость тока от разности потенциалов для молекул. Справа – первая производная данного графика

Что будет происходить при сдвигах потенциала вблизи минимума туннельного тока? (рис.9.8)

Неэластичное туннелирование электронов. Электрон, туннелируя, отдает часть своей энергии на возбуждение тех или иных колебательных степеней свободы молекулы.

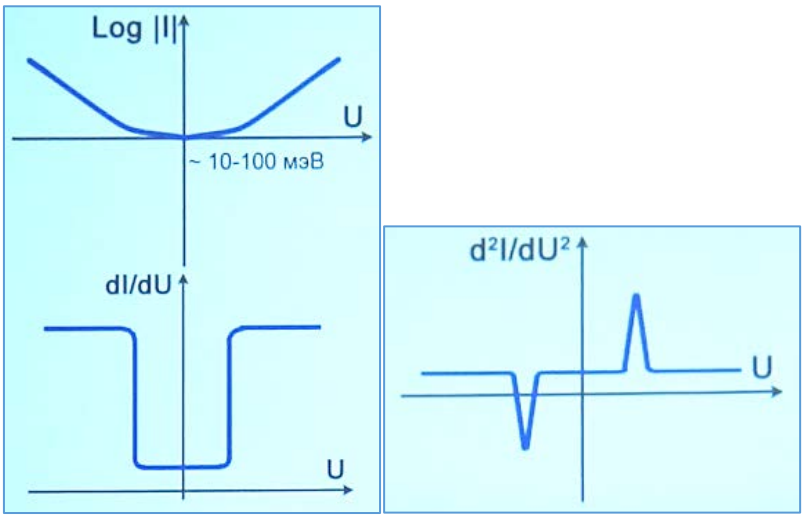


Рис. 9.8 Изменение туннельного тока вблизи минимума разности потенциалов

Резюме СТМ и СТС

1. Основа туннельной микроскопии – туннельный ток, протекающий между окончанием проводящего зонда и проводящим образом
2. Уровень исследований СТМ – атомы, молекулы, монослои молекул
3. СТМ-топография отражает плотность электронных состояний
4. Последовательное сканирование позволяет наблюдать динамику изменений на поверхности: химические реакции, 2D-диффузия, процессы перестройки 2D-фаз и тд.
5. Туннельная микроскопия позволяет изучать электронные состояния молекул или нанообъектов.
6. При правильном выборе разности потенциалов можно получить «рельеф» молекулярной орбитали
7. Неэластичное туннелирование электронов позволяет изучать некоторые колебательные моды единичной молекулы.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 10

В режиме постоянной силы (см лекция 9, Режимы работы микроскопии) движение зонда идет вдоль балки.

В режиме латеральных сил движения идет поперек балки. В этом случае на зонд со стороны образца действуют силы трения: если сила трения большая, то изгиб балкий тоже большой и наоборот. Соответственно, ведя зонд по образцу, можно измерять локальную силу трения. При этом на изгиб все также будет влиять и рельеф образца. Как избавиться от влияния рельефа?

Все довольно просто: зонд ведется по одной и той же линии сначала в одну сторону, затем обратно. Эффекты, связанные с перепадами высоты будут одинаковы на двух путях, а эффекты, связанные с силами трениями, будут различны и разнонаправлены.

Применение контактных методик ССМ

1. Исследование жерстких неорганических поверхностей, не разрушающихся под действием высоких вертикальных и латеральных сил (десятки-сотни нН)

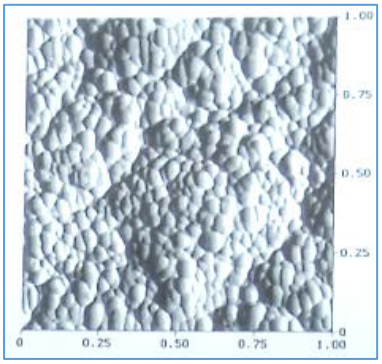


Рис. 10.1 Поверхность композита Al2O3/NdAlO3

2. Исследование бактериальных (есть клеточная стенка) и эукариотических (жесткий цитоскелет) клеток в среде воздуха или жидкости при работе с мягким кантилевером.

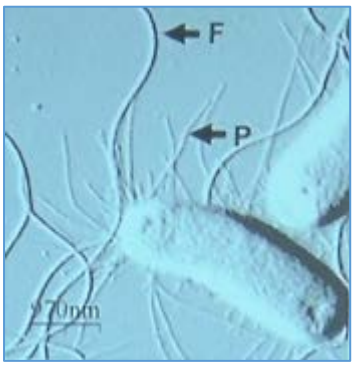


Рис. 10.2 E. Coli на слюде, сканирование на воздухе

Силовая спектроскопия

Выбранный участок поверхности размечается на точки, в каждой производится измерение кривых привода-отвода.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Над точкой устанавливается кантилевер, которые поднимается и опускается. Пока зонд далеко о поверхности, изгиб кантилевера равен нулю. При попадании конца зонда в область притяжения поверхности кантилевер изгибается, острие зонда «прилипает к поверхности»; некоторое время после этого продолжают давить зондом на поверхность. При поднятии зонда он оторвется от поверхности не сразу, так как его удерживают силы адгезии.

Из анализа кривой расчитывается *локальная жесткость образца*. Площадь между кривыми подвода и отвода – *работа адгезии* (корректно измерять только в жидкости либо полностью сухом воздухе, вакууме, чтобы исключить влияние капиллярных сил при слипании). Маскимальная сила отрыва – *сила адгезии.*

Резюме контактных методик ССМ:

- зонд находится в постоянном контакте с образцом
- устойчивое сканирование обеспечивается заданием небольшой силы нажатия на образец
- при сканировании в направлении, пермендикулярным кантилевера, можно регистрировать латеральные силы, например, локальную силу трения.
- контактные методики необходимы для изучения жеестких образцов
- силовая спектроскопия позволяет регистрировать локульную жесткость и локальную работу/силу адгезии при измерении в жидкости или вакууме

Динамические режимы ССМ

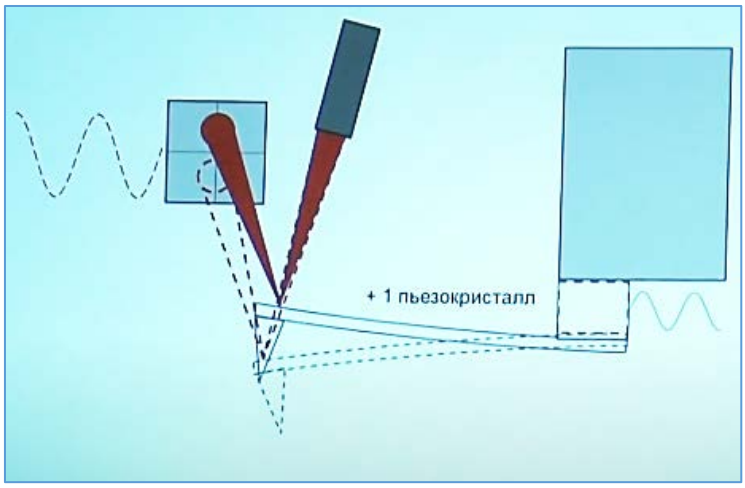


Рис. 10.3 Схема установки для динамического режима

Между держателем кантилевера и балкой устанавливается еще один пьезокристалл, на него подается напряжение. В этом случае закрепленное плечо кантилевера колеблется, как и его конец (рис. 10.3). В итоге снимаемый сигнал также колеблется с определенной частотой. Если оба сигнала, опорный (подаваемый на пьезокристалл) и изучаемый (снимаемый с датчика) подать на синхронный усилитель, то можно получить два других сигнала: амплитуда колебания окончания балки и сдвиг фаз (рис. 10.4).

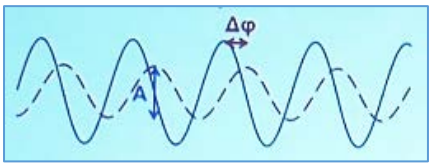


Рис. 10.4 Сравнение опорного и исследуемого сигнала

Теперь, если плавно менять частоты, то можно найти состояние резонанса (частота, при которой амплитуда колебания балки резко возрастает). Также будет менять сдивг фаз: до резонанса он будет близок к нулю, в положении резонанса строго 90º, после – больше 90º.

Кантилевер на резонансной частоте подводят к поверхности и наблюдают за изменением амплитуды колебания. Когда зонд попадает в нижней точке колебания в область притяжения поверхности, амплитуда немного возрастает.
Далее, если опускать зонд еще ниже, то с его попаданием по поверхности амплитуда начнет уменьшаться, также изменится разность фаз.
Итого, существуют два режима:

1. Бесконтактный режим в амплитудной модуляцией
Полученная топография является поверхностью постоянного градиента сил притяжения
Плюсы: минимальное воздействие
Минусы: нестабильность сканирование (трудно удерживать зонд именно в области притяжения), низкое разрешение, влияние электростатических сил

2. Прерывисто-контактный режим (полуконтактный, тэппинг)
Обычный прибор, стандартный кантилеверы, амплитуды 5-100 нм
Плюсы по сравнению с бесконтактным режимом: стабильность, более высокое разрешение, меньшее влияние дальнодействующих сил
Минусы по сравнению с контактным режимом: меньшее время контакта зонда с образцом, высокие частоты воздействия (большая эффективная жесткость образца), уменьшение влияние латеральных сил. Изучается адгезия и жесткость поверхности, также рельеф.

В последнее время данный режим стал доминирующим в изучении полимерных и биологических объектов.

Пример: исследование амилоидных фибрилл бета-лактоглобулина.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

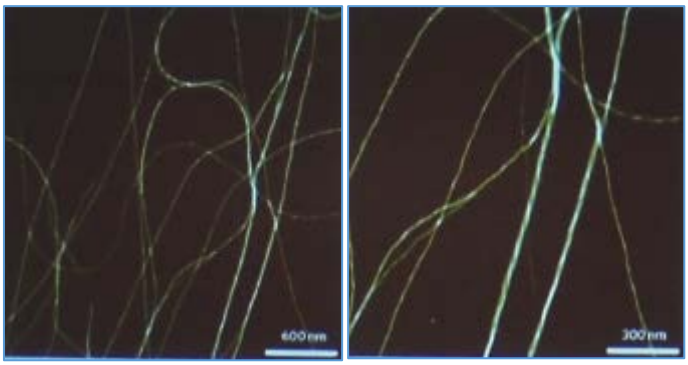


Рис. 10.5 Исследование структуры амилоидных фибрилл в динамическом режиме ССМ.

Выяснилось, что эффективна высота фибрилл меняется дискретно.

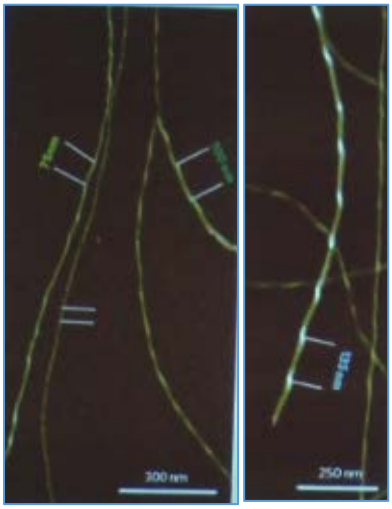


Рис. 10.6 Структура амилоидных фибрилл

Также была найдена зависимость периода спиралей, из которых состояли фибриллы, от высоты:

Период, нм	Высота, нм
35	4
75	6
100	8
135	10

На основе этих данных исследователи предположили, что самые тонкие фибриллы только из простой цепочки белков – «шариков». Фибрилла с шагом в 36 нм представляет последовательность «пар шариков», завитых в спираль. «Мономерами» более крупных фибрилл с шагом в 72, 108, 144 нм являются соответственно 3, 4,5 «шариков» в каждом шаге, завитыми в спираль.

Другой пример: исследование структур РНК-белок. Берутся 2 одноцепочечные РНК, так чтобы они имели по отношению друг к другу липкие концы. Они могут образовывать линейную, кольцевую и тд структуры. При связывании с определенным белком,

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

которые садится в областях взаимодействи с РНК, получается только одна фигура определьнной формы.

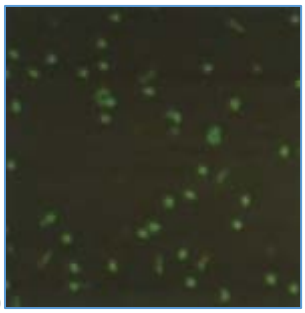
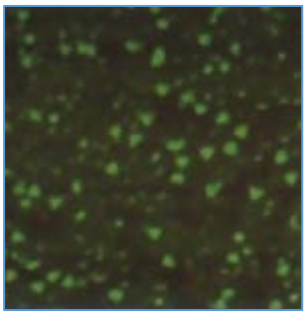
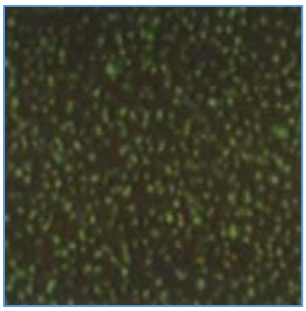
а)  б)  в) 

Рис. 10.7 а – только РНК (есть структуры различной формы), б – РНК с белком (видны специфические треугольные структуры), в – только белок; изображение получено в динамическом режиме ССМ

Современные подходы к комплексному изучению поверхностей

В наше время появляется электроника, позволяющая быстро принимать и обрабатывать сигналы, за счет чего можно проводить сканирование не отдельно по заранее заданным точкам, а прямо в процессе движения зонда. Такие режимы по разному называются у разных производителей: PeakFoce QNM, ScanAsyst, HybriD Mode.

Предполагается использование кантиливера не на резонансной частоте, а чуть ниже.

Свойства таких режимов:

- контроль максимальной силы воздействия зонда на образец: более бережное сканирование биологических образцов, меньший износ зонда на твердых поверхностях
- одновременно с топографией получается полуколичественная информация о жесткости образца и работе адгезии

Каким образом можно достичь увеличения скорости ССМ?

- уменьшать размеры балки, увеличивать резонансную частоту, что особенно актуально для измерений в жидкости
- применять «Быструю» электронику
- изменять свойства пьезоэлемента для подавления генерации (увеличения резонансной частоты пьезосистемы)

Если выполнить все эти требования, то можно действительно получить быстро работающую ССМ с частотой несколько единиц или десятков сканов в секунду. Это позволяет изучать динамику биологических систем практически в реальном времени (например, исследование движения миозина по актину, движения F1-АТФазы).

Двухпроходные методики на примере магнитной силовой микроскопии

Зонд покрывается магнитным материалом, помещается в магнитное поле. Если кантилевер в полконтактном режиме движется так, чтобы достаточно сильно «стучать» по поверхности, в этом случае силы отталкивания, пропорциональные 1/r12, будут превалировать над магнитными, и в результате получиться изучить только

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

рельеф.
Однако после этого кантилевер двигается еще раз тем же линиям, но поднятый на какую то фиксированную высоту (допустим, 10 нм). В этом случае сдвиг фаз колеблющегося кантилевера будет пропорционален градиенту магнитного поля, т..е изучается распределение магнитных доменов.

Резюмэ динамических методик ССМ:

- кантилевер колеблется на своей резонансной частоте
- с использованием синхронного усилителя регистрируются 2 сигнала: амплитуда колебаний окончания зонда и сдвиг фаз
- амплитуда используется в петле обратной связи для контроля среднего расстояния между зондом и образцом, т.е. для регистрации топографии
- динамические методики позволяют сканировать более мягкий образцы, чем в контактных режимах. Из-за этого для изучения биообъектов полуконтактная ССМ (тэппинг) используется в подавляющем большинстве случаев
- высокоскоростные методики требуют кантилеверов с высокой резонансной частотой, быстрой электроники, модификации всего сканирующего узла для подавления генерации. В этих условиях удается проводить сканирование с частотой несколько десятков кадров в секунду.
- в двухпроходных методиках измеряются дальнодействующие силы: магнитные, кулоновские и тд.

Практические аспекты ССМ

Измерения можно проводить в жидкостях, воздухе, иных газах, вакууме. Жидкость – важная среда, т.к. является естественной для большинствва биологических объектов.

Ожидаемые масштабы неровностей: от нанометров до единиц микрометров

Для модельных экспериментов по изучению топографических особенностей порядка нескольких нанометров необходимо использовать ровные **подложки**:

- высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ)
- слюда
(на сколах формируются терассы с атоманой гладкостью)
- кристаллические грани металлов
- пластины кремния для микроэлектроники

Для более крупных структур (клетки и тд) возможно использование более шероховатых поверхностей : стекло, полиэстерол и тд.

Модификации поверхностей:

Для ДНК – для иммобилизации отрицательно заряженной ДНК на слюде поверхность модифицируется аминопропил(триэтокси)силаном (APTES), который создает положительный заряд. Также можно использовать двухвалентные ионы

Для бактериальных клеток, которые также заряжены отрицательно – поверхность обрабатывают растворимыми поликатионами (поли-L-лизин, полиэтиленамин)

При иммобилизации объектов из растворов:

1. Нельзя высушивать раствор на подложке – иначе получается пленка толщиной в микрометры. Допустима только адсорбция с последующими промывками.

2. Первая отмывка осуществляется тем же буфером, в котором находятся объекты, чтобы смыть все, что держится непрочно.

3. Последняя промывка – водой, чтобы предотвратить формирование кристаллов буфера.

На ССМ-изображениях искусственно созданных образцов на гладких подложках необходимо проводить выравнивание уровня подложке при обработке изображения. Для этого, если подложка ровная, изображение отсекается на определенной высоте, все что ниже – обозначается подложкой, все что выше – объектом, измеряются различные свойства и получают таблицу характеристики объектов.

Силовая спектроскопия единичных молекул

Используется тот же принцип, что и при силовом картировании поверхности – регистрация кривых подвода-отвода. Представим, что на поверхности иммобилизован белок. Зонд подводится к нему до «прилипания», затем отводится. При этом зонд конец кантилевера прогибается вниз. В определенный момент белок, сцепленный как с подложкой, так и с зондом, разворачивается. Таким образом можно изучать силы разворачивания единичных белковых молекул и комплексов субъединиц.

В реальности это происходит немного по-другому. В белке находят две точки, пригодные для крепления для растягивания, в этих точках аминокислоты модифицируются на цистеины, в раствор белка добавляется окисленный тиол, и в этих точках образуются дисульфидные связи между молекулами белка. Полученный полимер иммобилизуется на поверхности; зонд подводится к молекуле на некоторое время, чтобы какая то часть белка за него зацепилась. Затем зонд постепенно отводится, происходит разворачивание одной из составных частей полимера, при дальнейшем растягивании разворачивается следующая; таким образом разворачивается несколько одинаковых белковых молекул. *Пример:* исследование разворачивания молекул GFP.

Силовая спектроскопия единичных межмолекулярных взаимодействий

Так тянуть можно не только внутрение свойства белков. Можно изучать межмолекулярные взаимодействия. Для этого один компонент, например белок, иммобилизуется на поверхности, а лиганд – на зонде. Таким же образом подвода-отвода зонда снимаются данные о разрыве связей между ними. На одном зонде чаще всего не получается пришить только один лиганд, поэтому в итоге снимаются многократные взаимодействия лиганд-белок. Контролем является добавление в раствор свободного лиганда, связывающего все доступные рецепторы, так что не наблюдается взаимодействий с зондом.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Резюме силовой спектроскопии единичных молекул:

- измерение сил разворачивания индивидуальных структурных доменов белка. Если белок монодоменный, то измеряется фактичеки сила разворачивания всей молекулы белка.
- для контроля направления модифицируют аминокислотные остатки в нужных точках, заменяя их нав цистеин и формируя дифульфидные связи
- иммобилизовав на зонде один компонент пары, а на поверхности – второй, тем же методом можно измерять силы специфических взаимодействий индивидуальных молекул (контроль: исчезновение взаимодействий при добавлении компонента, иммобилизованного на зонде, в раствор)

Методы СЗМ-литографии

Плюсы методов:

- высокое разрешение
- широкий спектр возможных объектов манипуляции и создаваемых структур
- возможность сразу визуализировать результаты литографии

Недостаток:

- низкая производительность (может занимать недели и более, соответственно на данный момент применение исключительно лабораторное)

Методы:

1. СТМ:

- Манипуляция отдельными атомами на гладких поверхностях (зонд опускается настолько, что связывается с единственным атомом из примесных, с помощью поддерживаемого туннельного тока передвигает атом, процедура проводится при крайне низких температурах))
- Токовая литография

2. ССМ:

- Механическая литография (статическое и динамическое наноиндентирование, передвижение объектов зондом; используется в т.ч. для определения толщин плотных пленок биомолекул)
- Локальное окисление материала подложки
- Электронная полевая полимеризация
- Локальное нагревание подложки
- Перьевая нанолитография

3. СБОМ:

- Оптическая литография на светочувствительных полимерах

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 11

Современные особенности системной биологии

Сейчас биологическая наука находится на этапе, можно сказать, системных исследований, когда любой объект изучается не в отдельности, а в контексте сложных живых систем.

Так, например, функции большого количества белков зависят от кальция. В т.ч. от содержания кальция и его динамического распространения зависит активность очень большой группы белков, связанной с передачей нервного импульса. Изменение локальных концентраций кальция в нейроне происходит волнами, и зафиксировать эти изменения при исследованиях in vitro в фиксированном препарате не представляется возможным. Поэтому получать сигналы подобных систем нужно развернутыми во времени.

Так, большинство данных, используемых для построения математических моделей взаимодействий различных молекул, было получено из экспериментов in vitro. Но становится все более очевидно, что такие данные не могут описать всю сложность и индивидуальность взаимодействий молекул в живой клетке. Эти ограничения могут быть преодолены с помощью прижизненной микроскопии клеток, которая позволяет исследовать биохимию клетки in vivo. Именно такой уровень исследования является современным этапом развития системных исследований.

Развитие микроскопии

В последние 20 лет активно развивалась флуоресцентная микроскопия, которая перешла в субдифракционный режим, так что стало возможным рассмотрение объектов 10-20 нм, стало возможным наблюдать прижизненные процессы живых клеток.

Каков размер изучаемых объектов?

Наблюдаемый размер меток: кислорода – 0,5 нм, воды – 0,27 нм, АТФ – 1,4 нм.
Диаметр ДНК – около 2 нм. GFP ~ 3 нм, представляет собой «бочонок» 2x4 нм.
Рибосомы – 20-35 нм. Разного рода нуклеопоры – 80-150 нм. Один из широко распространенных объектов – E. Coli – 500 нм.
Alexa Fluor 647 (ароматический флуорофор) – 2 нм, SNAP-tag – 3 нм, антитела – 10-15 нм.

Ранее световая микроскопия имела дифракционный барьер (200-250 нм), сформулированный в критерии Аббе (что он равен половине длины световой волны, разделенной численно на апертуру объектива).

Кроме пространственной шкалы размерность, есть шкала также временная:

Явления флуоресценции – наносекунды, конформационные изменения белков – пикосекунды-наносекунды, доменные движения как правило соответствуют микросекундам, явления цис-транс изомеризации – микросекунды, диффузия свободных молекул – сотни микросекунд, диффузия E.coli в бульоне ~ миллисекунд, диффузия мембраносвязанных белков – приближаются к секундам. Транскрипция и

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

трансляция (биосинтез белка) – несколько оснований в секунду. Репликационные циклы – часы и более.

Устройство микроскопа

В любом микроскопе есть источник света, в данном случае их два. Один – источник проходящего света для фазового контраста и других методов просвечивания клетки, второй – верхний источник эпифлуоресценции, для проведения флуоресцентных измерений.

Возбуждающий свет проходит к объекту, а обратно идет только свет флуоресценции, возбуждающий отсекается. Каким образом это происходит? Для этого существуют специальные фильтр-блоки (рис. 11.2). В нем установлен входной фильтр на длине волны возбуждения. На выходе установлен фильтр к детектору, пропускающий только основной флуоресцентный пик. В промежутке между ними установлено дихроическое зеркало. Дихроическая пластинка Брумберга впервые была изобретена в 30е годы в России. Когда эта пластинка установлена под углом 90 градусов, то в одну сторону работает как зеркало, так что возбуждающий пучок света идет на образец, а в обратную сторону полностью пропускает и ничего не отражает.

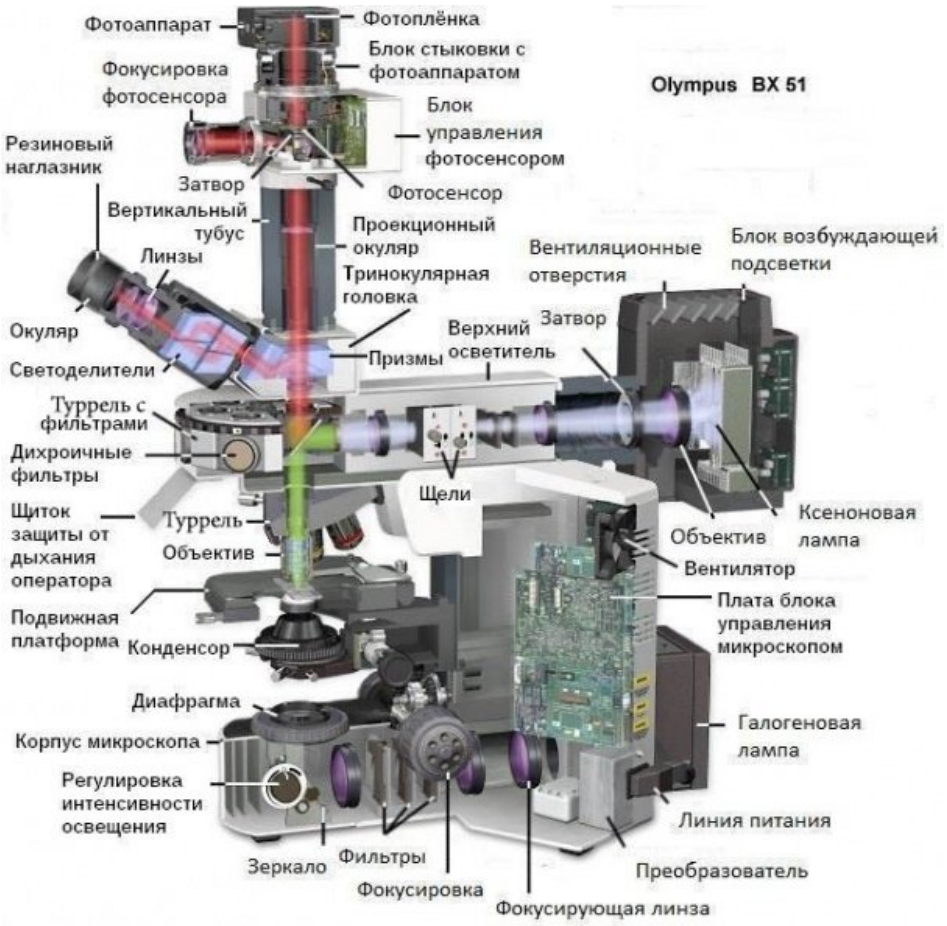


Рис. 11.1 Строение флуоресцентного микроскопа

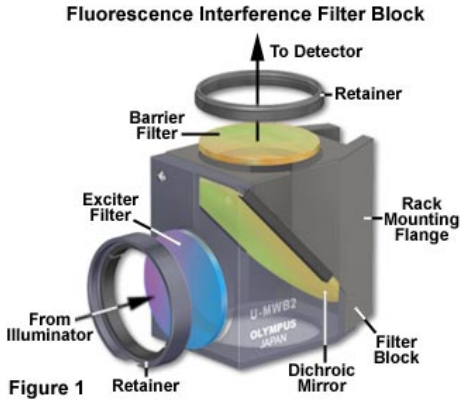


Рис. 11.2 Фильтр блок с дихроическим зеркалом

Функция распределения точечного источника света

Если есть единичный точечный источник света, то при прохождении света от него через микроскоп появляется специфическая картинка - дифракционный узор, включающий пятно и концентрические яркие кольца вокруг него, известный как узор Эйри – или же – функция распределения точечного источника света (Point spread function). Человеческий глаз воспринимать кольца как шум, и видит только основной пик в виде светящегося пятна. Когда две точки сильно сближены друг с другом, различить их становится невозможно (рис. 3). Именно от этого зависит оптический предел разрешения световой микроскопии.

$$Xmax=0.61\,\lambda/NA$$

В дальней красной области разрешение будет хуже, в дальнем ультрафиолете – лучше. Итого, разрешение светового микроскопа латеральное составляет порядка 200 нм, аксиальное разрешение – 500 нм.

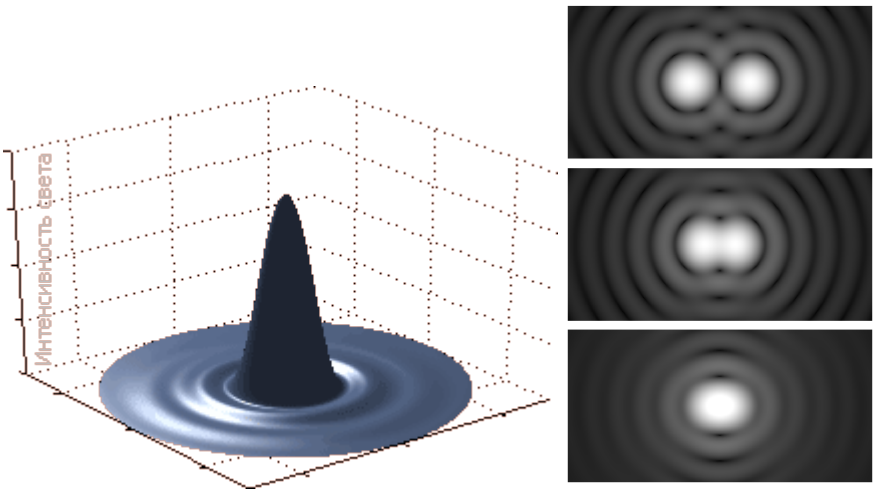


Рис. 11.3 Функция распределения точечного источника света и сближение двух точек.

Конфокальная микроскопия

Клетка имеет вполне определенные размеры, обычно – микрометры. Марвин Минский предложил использовать **pinhole** (небольшое отверстие). Свет фокусируется в

фокальной плоскости. Объект может лежать как в ней, так и выше, или ниже ее. Луч, сфокусированный в фокально1 плоскости, возбуждает также молекулы, находящиеся ниже этой плоскости. Флуоресцентный свет от молекул из фокальной области собирается линзами и проходит обратно через pinhole, в то время как свет, идущий от остальных молекул, подходят к апертуре расфокусированным и ослабленным как минимум на порядок (энергия падает пропорционально квадрату диаметра пятна).

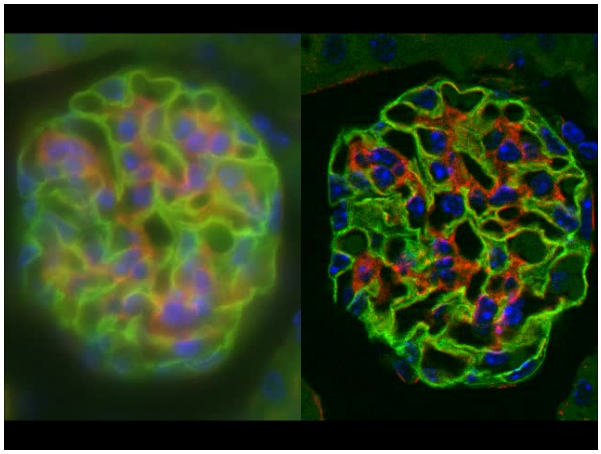


Рис. 11.4 Изображения, полученные с помощью широкопольной (widefield) и конфокальной микроскопии

Способы получения изображения

Принцип пошагового сканирования

Изображения в микроскопии получают разными способами, и один из них - принцип пошагового сканирования. Предполагается, что образец движется над объективом. Как правило, биологические объекты рассматриваются снизу, и соответствующие микроскопы называются инвертированными. Самые точные механизмы для движения объекта над объективом – пьезодвигатели, их точность составляет порядка 1 нанометра (в то время как разрешение микроскопа – 200 нм), но они представляются крайней медленными. Микроскопы этого принципы применяются, т.к. имеют большую чувствительность за счет долгого накопления информации в одной точке.

Другой способ – **лазерное сканирование**.

И образец, и объектив неподвижны, подвижный элемент – это зеркало сканирования, располагающееся после источника лазера и зеркала, оно позволяет довольно быстро сканировать образец от миллисекунд до секунд.

Двухфотонная спектроскопия

Работая без лазеров, просто при очень мощных лампах, Мария Гепперт-Майер предсказала довольно интересный процесс: если есть полоса поглощения, рядом пик эмиссии, то если взять длину волны в два раза больше максимума поглощения и достигнуть плотности мощности такой, чтобы на молекулу приходило одновременно два фотона, то два фотона через виртуальный уровень два фотона поглощаются вместе, и молекула излучает квант света (антистоксовая флуоресценция).

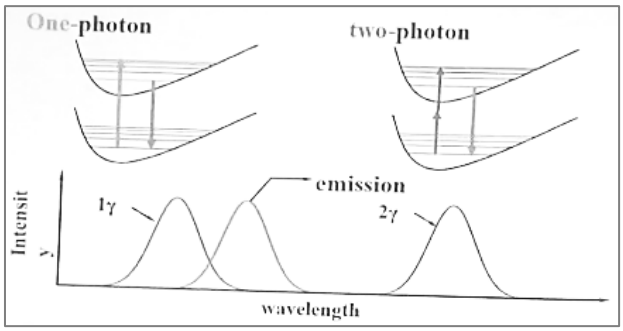


Рис. 11.5 Принцип двухфотонной спектроскопии: пики поглощения, эмиссии

Чем интересно антистоксово свечение?

Прежде всего, в дальней красной области все «паразитные» свечения, возникающие на данных длинах волн, уходят все дальше в красную область, где их легко отсечь фильтрами. Также большой плотности фотонов можно достичь только в крайне малой точки, что также соответствует принципам конфокальной микроскопии. Многофотонное поглощение позволяет использовать ту часть спектра, где не поглощают в норме другие соединения клетки. Двухфотонную микроскопию часто применяют для изучения следующих объектов:

1) НАДН
2) толстые слои сильно рассеивающих образцов – кожа, срезы мозга.
Из-за опасности лазеров для человеческого глаза в современных микроскопах при включении лазера автоматически перекрывается доступ света к бинокулярам.

Флуоресцентная детекция одиночных молекул

Метод молекулярных буйков.

В химической кинетике редко измеряют параметры единичных молекул, обычно работают со статистическими ансамблями. Однако возможно работать и с единичными молекулами.

Если взять ДНК, участок которой таков, что при налипании на комплементарную поверхность имеет энергию, приводящую как разрушению двойной спирали. Это происходит так: раствор с ДНК подогревается, спираль раскручивается, цепь ДНК налипает на поверхность, и если соблюдается условия по энергии этого участка, то при остывании раствора молекула не сворачивается обратно, а остается в развернутом состоянии. На один конец ДНК пришивается флуоресцирующая молекула, на другой конец – тушитель. В развернутом состоянии ДНК тушитель и флуоресцентная молекула находятся далеко друг от друга, флуоресценция возможна.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

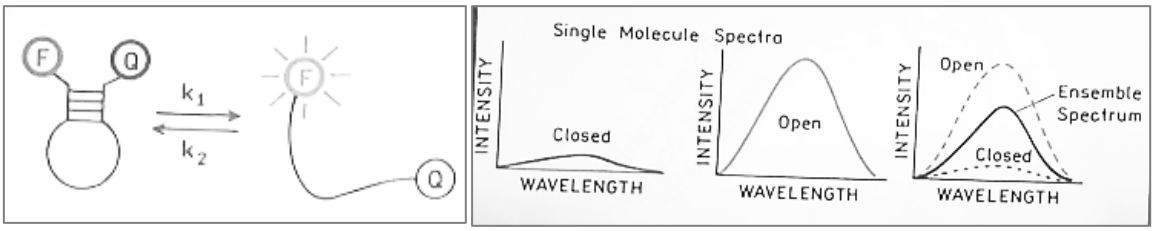


Рис. 11.6 Основы метода молекулярных буйков. Для единичных молекул четко различима разница сигналов свернутого и развернутого состояния молекулы, для ансамбля видно только статистическое усреднение между ними.

Что мешает видеть свечение одной молекулы?

Романовский спектр. Когда через растворитель проходит пучок света, то оказывается, что частоты от колебаний внутри молекулы накладываются друг на друга при прохождении электрической волны, получаются на спектре уменьшенные по энергии (или увеличенные) полосы. Поэтому на спектре невозможно зачастую различить вклад флуоресценции и романовского спектра. Уменьшить влияние романовского спектра можно уменьшая объем, в котором происходит измерение. Так, при измерении, флуоресценция 1 молекулы родамина 6G и романовское рассеяние воды будут 1:1 в объеме 4,6 микрон, и $1:10^{-2}$ в объеме 1 микрон (характерные объемы конфокальной микроскопии). Таким образом изучение флуоресценции одиночных молекул получило широкое распространение с изобретением конфокальной микроскопии.

Другой подход (total reflection spectroscopy): основан на эффекте полного внутреннего отражения. В момент отражения часть электромагнитной волны (затухающее поле) проходит в образец и возбуждает в исключительно маленьком объеме (достигает 1 фемтолитра).

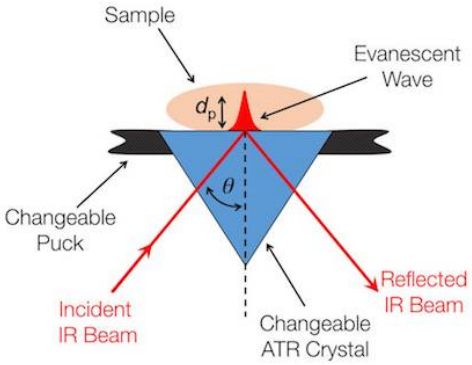


Рис. 11.7 Total reflection spectroscopy

Исследования одиночных молекул проводятся например для: АТФаз, белков-шаперонов.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

Позволяет детектировать одиночные молекулы в объеме.
Концентрация в-ва: 1 наномоль.
Объем: 1 фемтолитр, где можно регистрировать одну единственную молекулу.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Получается, что в 1 фемтолитре 0,6 молекул
Получается распределение Пуасона:
с вероятностью 0,55 в объеме нет молекул
с вероятность 0,33 – 1 флуоресцирующая молекула
с вероятностью 0,1 – две

Получается **корреляционная функция:**

$$G(t)=<\delta F(t)\,\delta F(t+\tau)>/<F(t)>^2$$

В наблюдаемый объем диффузией могут заходить одна, две молекулы (статистически), могут уходить по одной или вместе, сигнал будет пропорционален.

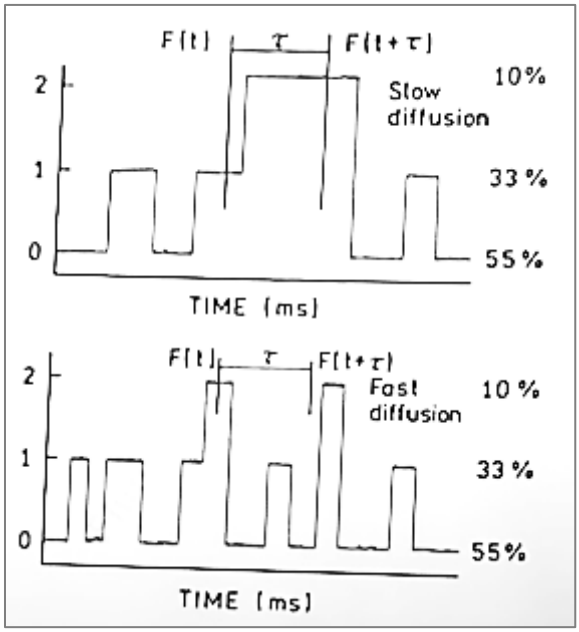


Рис. 11.8 Графики распределения молекул в объеме по времени по интенсивности сигнала.

Время жизни возбужденных состояний

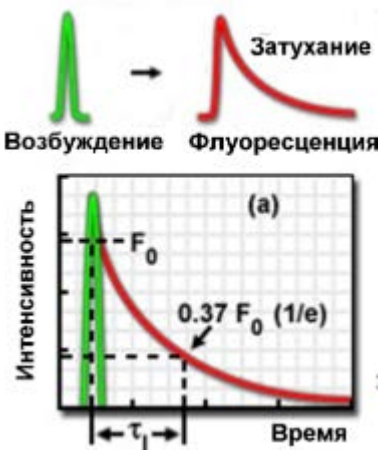


Рис. 11.9 График перехода из возбужденного состояния в невозбужденное

Если возбудить популяцию молекул, то в основное невозбужденное состояние они буду переходить в соответствии с релаксационными константами (это описывается экспонентой, рис. 11.9). Происходит следующее: возбуждение с состояния S0 до S1 и S2 за 10^-15 с, внутримолекулярные колебательные движения (10^-12с); с уровня S1 есть несколько путей, и при регистрации испускания энергии этими путями ансамблем молекул можно наблюдать классическую экспоненциальную кривую затухания.

Время жизни – это характеристика структуры молекулы, не зависит от концентрации молекул, интенсивность освещения, фоторазложения и многих других параметров. FLIM - fluorescence lifetime imaging microscopy – с помощью этих методов можно изучать вязкость, pH, многие характеристики биохимических реакций. Также время жизни возбужденного состояния в сочетании со спектров флуоресценции позволяет идентифицировать многие соединения. У этого метода есть и недостатки: сложность интерпретирования полученных данных, не существует простых линейных формул для описания, дороговизна оборудования.

Чтобы получать данные о временах флуоресценции на микроскопе применяют коррелированный счет фотонов: работает лазерный источник света, дающий короткие вспышки, свет проходит через образец, при этом часть фотоном попадает на образец, часть – на электронику, которая открывает транзистор и начинает заряжать конденсатор. Как только на детектор попадает первый фотон, он останавливает конденсатор и смотрит его заряд. Таким образом можно мерить заряды от фемто- до наносекунд. Собирается статистика событий с помощью ячеек гальванопары, в каждом пикселе собирается информация по кинетике затухания сигнала. Это дает возможность определять локальное окружение, индуктивно-резонансный перенос энергии (FRET), скорости вращения молекул в растворе (эффекты поляризации).

FRET – донор и акцептор должны иметь область перекрывания, тогда на длине возбуждения одного вещества наблюдается флуоресценция другого вещества. По эффективности индуктивно-резонансного переноса можно определить расстояние их взаимного расположения. Расстояние безызлучательного переноса составляет ангстремы – значительного короче длины волны.

Лекция 12

Субдифракционная микроскопия

Пример использования субдифракционной микроскопии.

Было предположено два варианта движений миозина V: движение «циркулем» (закрепление одного конца на цепи, поворот молекулы, закрепление другого конца и т.д., теоретически соответствовало продвижению на 74 нм) и движение «червем» (подтягивание одного из концов молекулы вперед, продвижение на 37 нм). Молекулу миозина флуоресцентно пометили в одной точке, и добавляли АТФ для совершения единичных движений молекулы. Помеченные молекулы миозина выступали в роли точечного источника света, с помощью пьезомоторов удалось достичь накопления большого количества информации в каждой точке в течение некоторого времени. Измерения удалось провести с разрешением 1 нм. Оказалось, что миозин совершает шаги в среднем 73-75 нм, значит, верной является модель «циркуля». В итоге было показано, что, если удастся расположить исследуемые точки далеко друг от друга и построить для каждой точки функцию распределения точечного источника, то можно фиксировать положение точек с точностью до 1 нм.

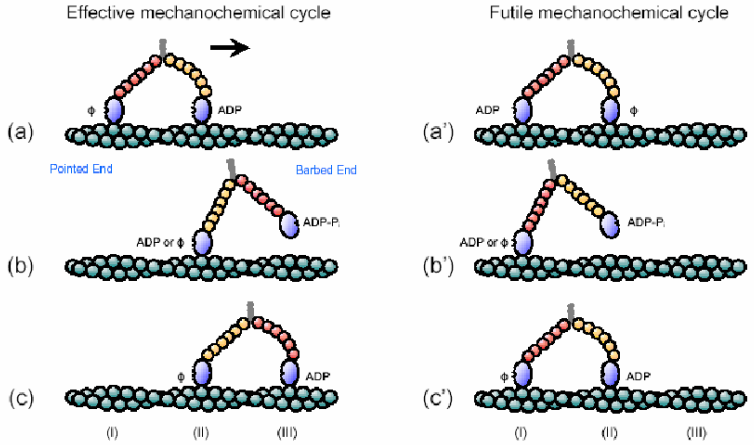


Рис. 12.1 Две модели движения миозина

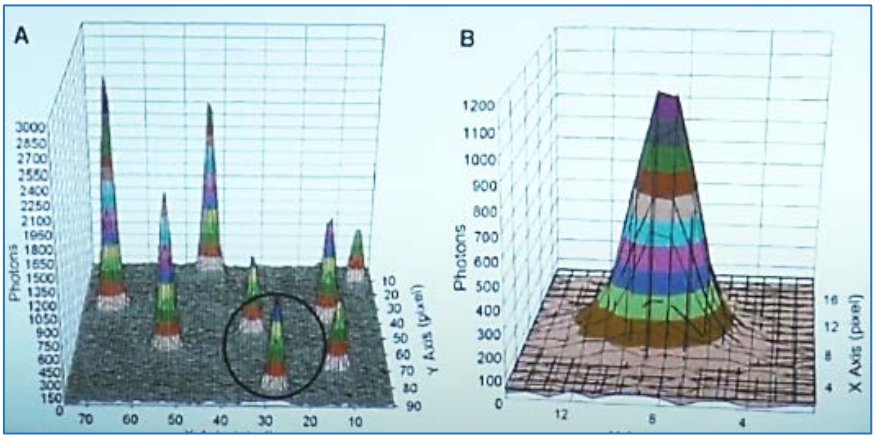


Рис. 12.2 Функция распределения точечного источника

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Метод PALM – photoactivated localization microscopy

Белок Kaede: этот белок имеет третичную структуру в виде бочонка. Внутри бочонка формируется структура с тремя аминокислотами: глицин, тирозин, гистидин. Под воздействием света ~400 нм у гистидина разрывается пептидная связь, образуется двойная связь, гистидин входит в сопряжение с хромофором, который из зеленого становится красным или оранжевым.

Теперь раствор этого белка облучают небольшим количеством света так, чтобы некоторое количество белка перешло в красную форму, регистрируют светящиеся пятна, находят их положение максимума, сохраняют в памяти компьютера. Далее наращивают мощность лазера так, чтобы выжечь эти активированные молекулы. Данный цикл повторяется множество раз. В итоге при суммировании всех полученных данных получается изображение с точной локализацией молекул. Чувствительность данного методы сейчас составляет порядка 10-20 нм. Метод позволяет изучать клетки in vivo.

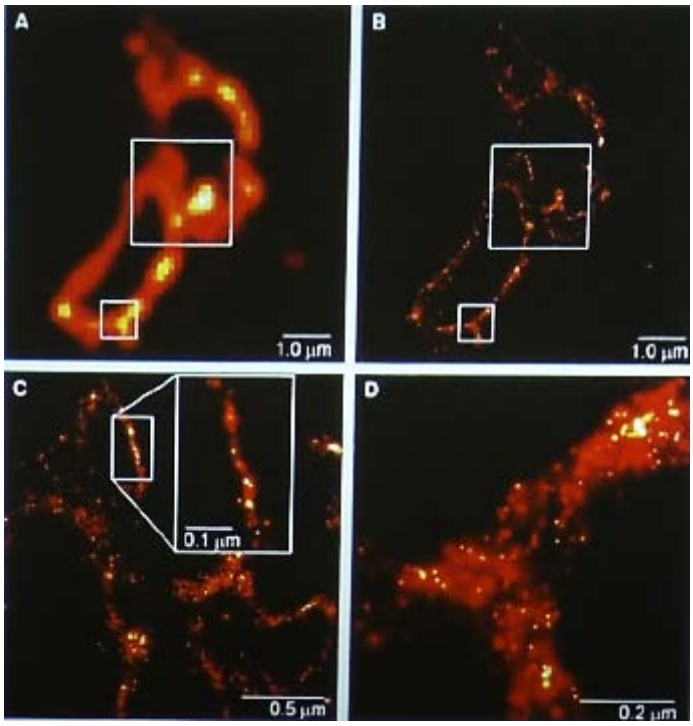


Рис. 12.3 Экспрессия COS-7 клеткой лизосомального трансмембранного белка CD63, флуоресцентно меченного белком Kaede. A – обычная микроскопия TIRF, B,C,D - применение метода PALM

Метод STORM

Метод также использует последовательную активацию и временное разрешение локализации фотопереключаемых флуорофоров для создания изображений с высоким разрешением. Во время обработки изображений только небольшое количество флуорофоров находится в флуоресцентном состоянии в данный момент времени, таким образом положение каждого флуорофора может быть определенно с высокой точностью путем нахождения центра положения каждой молекулы.

Многие молекулы под действием различных длин волн света стохастически мерцают, и, строя статистику их свечения, можно также получать создавать микроскопию крайне высокого разрешения.

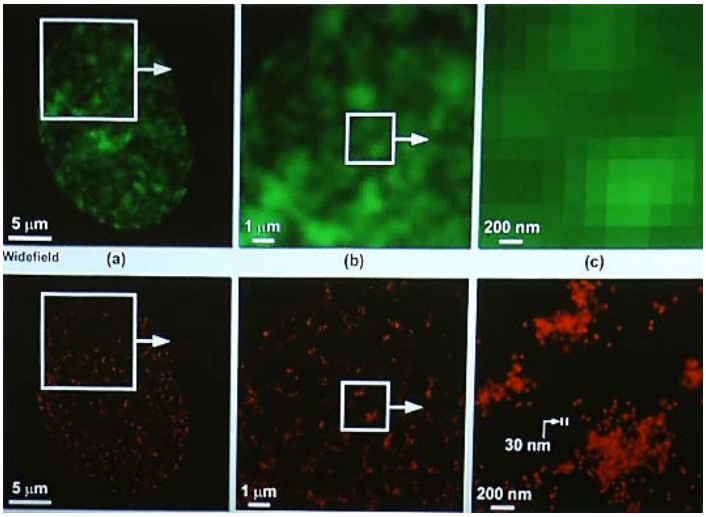


Рис. 12.4 Верхний ряд – широкопольная микроскопия, нижний ряд – метод STORM

Не смотря на принципиальную возможность использовать эти методы с живыми клетками, важно проверять жизнеспособность образцов после проведения экспериментов, т.к. в них используются облучение светом, часто коротковолновым, который является токсичным для клеток.

Метод STED – stimulated emission-depletion

Идея состоит в том, что, если есть функция распределения точечного источника, то можно поменять форму распределения, делая его более узким с тем, чтобы получить большее разрешение.

Существует явление стимулированной эмиссии. Первым ее теоретически описал Альберт Эйнштейн: он показал, что поглощение и излучение света – процессы симметричные. Определенный пучком света можно вызвать стимулированную эмиссию. Если на нормальное распределение света источника наложить дополнительное «кольцо» свечения высокой мощности, то вызовется стимулированная эмиссия точек, излучение от которых идет в другие стороны, и останется только одна небольшая точка (рис.12.5,12.6).
Разрешение: 60-80 нм

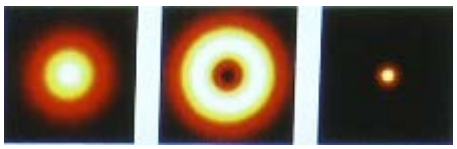


Рис. 12.5 Стимулированная эмиссия

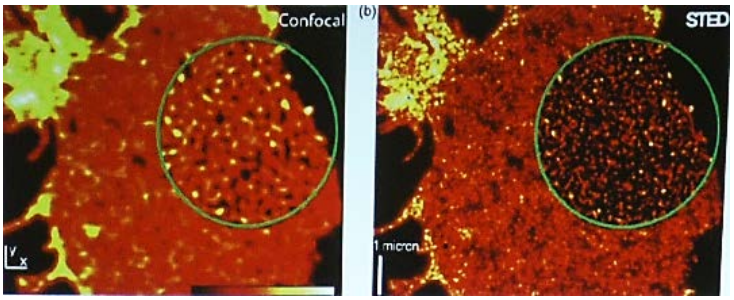


Рис. 12.6 Слева – широкопольная микроскопия, наложение в круге – конфокальная микроскопия. Справа – метод STED.

Итого, главное условия для использования субдифракционных методов на обычном световом микроскопе – это наличие флуоресцентной метки, способной пребывать в двух разных состояниях (разные цвета состояний, яркая флуоресценция/темное состояние и т.д., т.е. два состояния, различных по цвету или интенсивности свечения)/

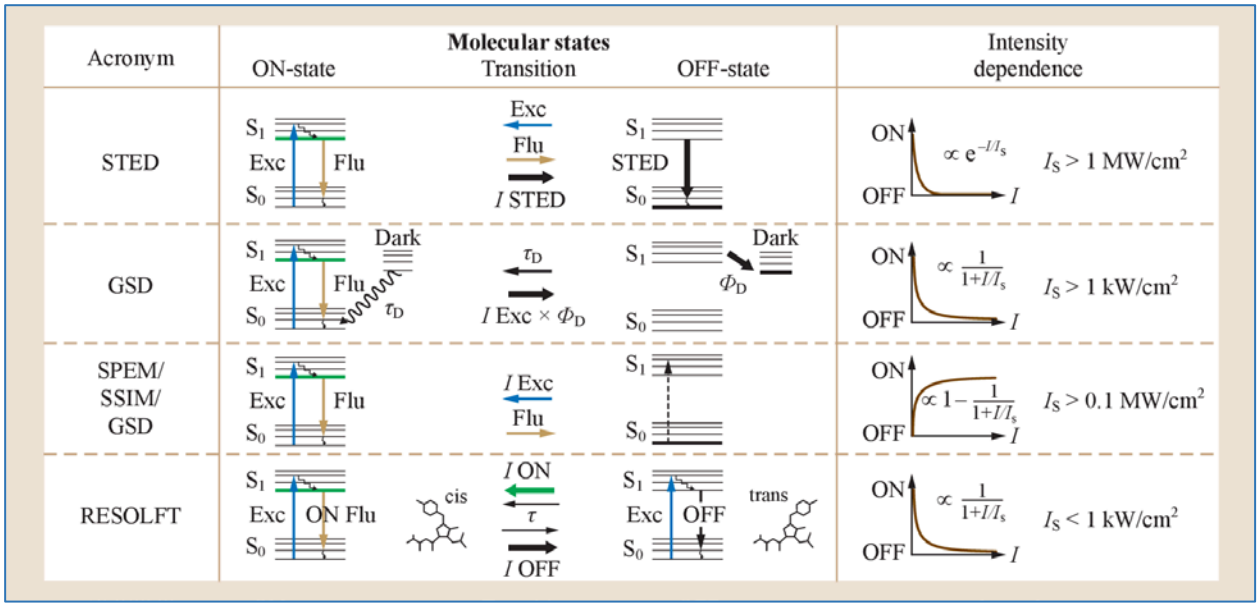


Рис. 12.7 Другие методы субдифракционной микроскопии

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

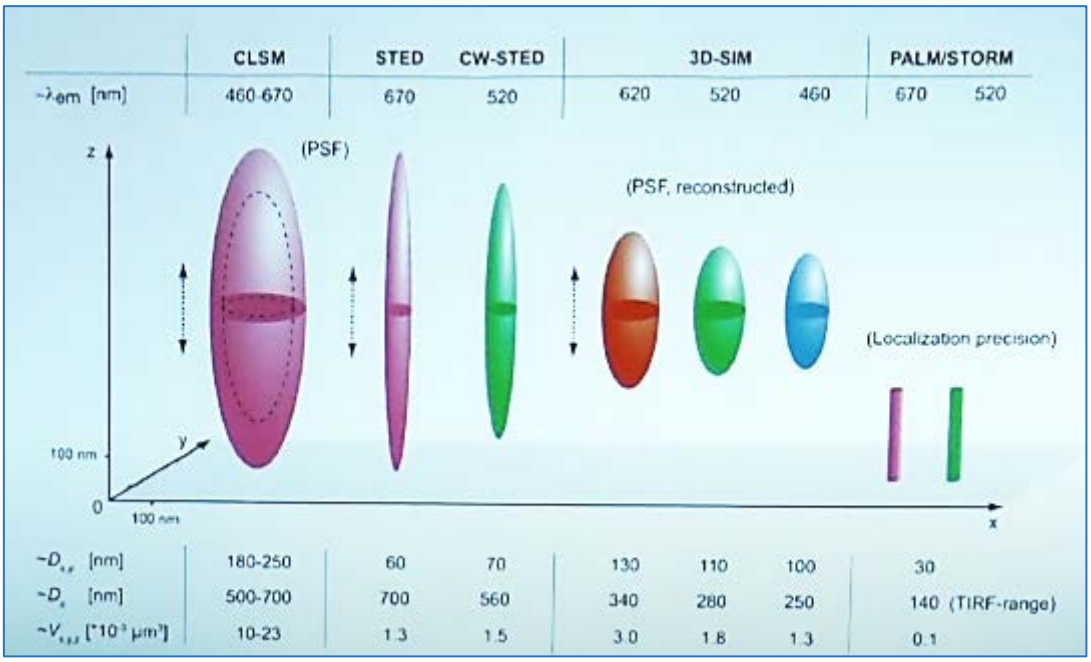


Рис. 12.8 Сравнение фокальный объемов различных методов

Чем отличается современная субдифракционная микроскопия от обычной световой микроскопии?

- Источник света работает по специальному алгоритму
- Особые требования к флуоресцентной метке, состояния on-off
- Компьютерное накопление данных и их последующая визуализация

Системная биология

На данный момент все больший уклон делается в сторону изучения биологических систем как целого, а не как отдельных объектов в пробирке. Исследования на живых клетках in vitro не учитывают взаимодействий между клетками. Так что эксперименты на клеточных культурах подходят для исследований только субклеточных событий. Если необходимо видеть поведение клетки в целом, но надо переходить как минимум на модели ансамбля клеток. В простейшем случае – это сфероид (монокультура, не распластанная на поверхности, а образующая шарик, размеры доходят до 100 микрон). На самом деле, даже когда речь идет об онкологических заболеваниях, никогда не встречаются опухоли, состоящие только из раковых клеток, т.к. они тесно взаимодействуют с макрофагами. Модели с макрофагами получили название 3D моделей.

Производство медицинских препаратов (см повторение в 1 лекции)

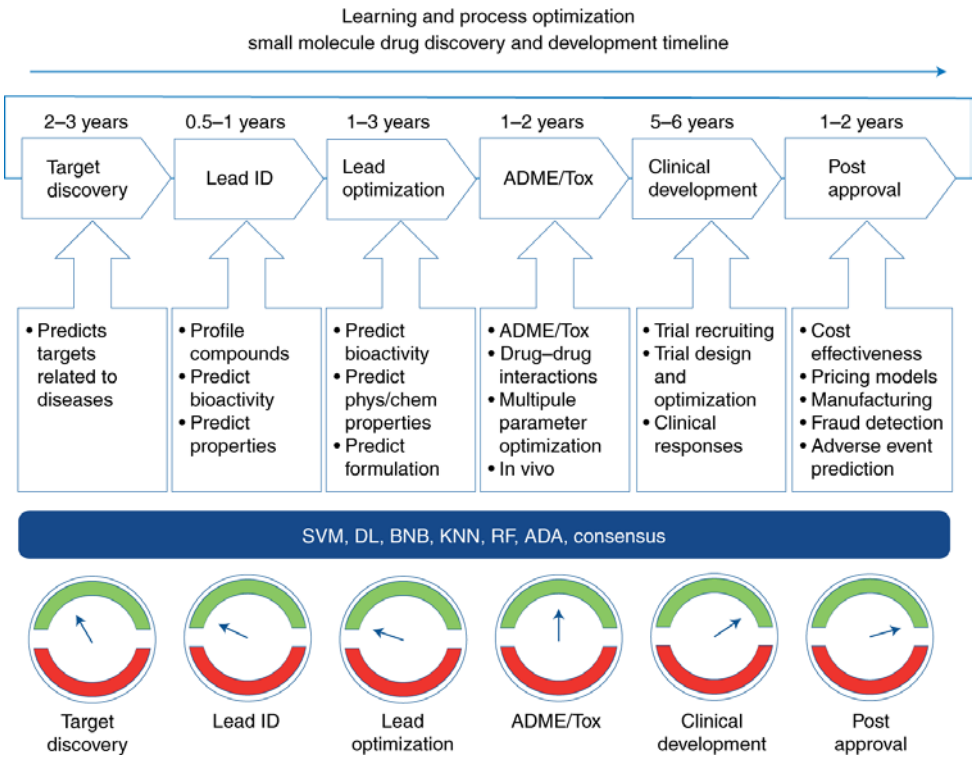


Рис. 12.9 Путь производства медицинских препаратов

Наиболее подходящими лабораторными животными являются мыши, т.к. имеют короткий репродуктивный цикл, небольшую продолжительность жизни (меньше чем у собак, кроликов). Практически все методы применимы к мышам – PET, МРТ, электронно-позитронные, биолюминисцентные методы.

Каждый метод обладает своими преимуществами и недостатками. По глубине проникновения и удобным размерам измерения наиболее адекватными для животных, в т.ч. человека являются PET, МРТ, ультразвуковые исследования, оптически когерентная томография.

По временной развертке: именно флуоресцентные методы дают максимально детализированную молекулярную картину во времени, МРТ подходит для физиологических процессов.

Двухфотонный микроэндоскоп

Фактически, двухфотонный микроскоп помещен в иглу диаметром 1,4 нм. Используется для:

- Внутритканевая визуализация при работе с мелкими животными
- Клиническая визуализация кожи человека
- Тканевая инженерия
- Косметологические исследования, исследования старения кожи
- Мониторинг лекарственных препаратов in situ
- Исследование стволовых клеток

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

- Детекция флуоресцентных белков
- Проникновение в ткани мозга и их изучение через заранее подготовленное отверстие

Клеточный и молекулярный in vivo имиджинг

На животных-биомоделях проводится изучение опухолевого роста, метастазирования, ангиогенеза, оценка эффективности противоопухолевых средств. Например, бестимусным мышам прививают человеческие опухоли и наблюдают за их развитием в условиях системного микроокружения тканей. Технология довольно сложная, т.к. сначала вводится генно-инженерная конструкция в линию опухолевых клеток для получения флуоресцирующих опухолевых клеток. С помощью такого имаджининга можно отслеживать микрогетерогенность опухолей при воздействии на них лекарств (некоторые клетки остаются нечувствительно к воздействию).

Различия между измерениями in vivo и in vitro определяются двумя группами факторов:

1. Различное оптическое окружение.

Первичные данные, полученные при измерениях с живых животных или клеток должны обозначаться как «вероятностные данные», зависящие от рассеивания фотонов, показателей преломления, а также стадий клеточных циклов, положения в организме.

2. Процессы de novo.

Происходит синтез субстрата, рост клеток, происходят смещения, которые также нужно правильно интерпретировать.

ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА