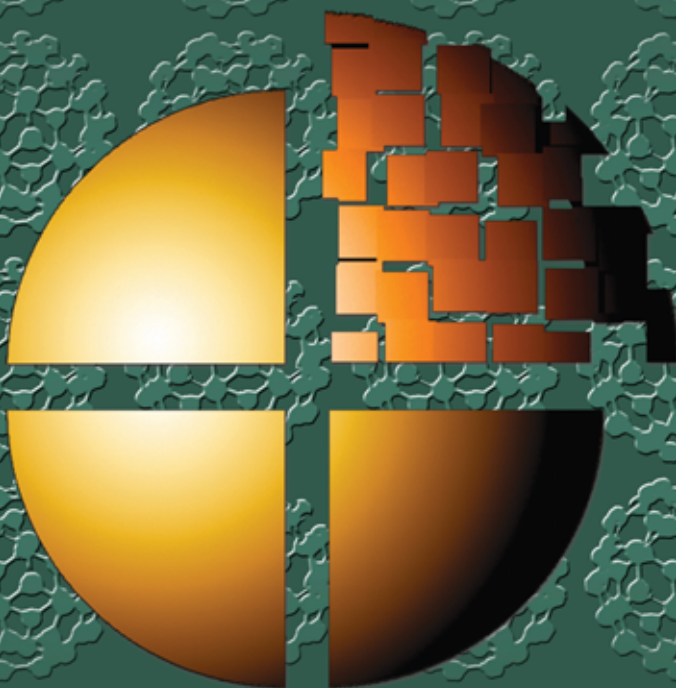


● ● ● НАНОТЕХНОЛОГИИ ● ● ●

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

ПРАКТИКУМ



ИЗДАТЕЛЬСТВО

БИНОМ

● ● ● НАНОТЕХНОЛОГИИ ● ● ●

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

ПРАКТИКУМ

Под редакцией
чл.-корр. РАН А. Б. Рубина



Москва
БИНОМ. Лаборатория знаний
2011

УДК 57
ББК 28.07
Н25

Серия основана в 2006 г.

Авторы:

А. М. Абатурова, Д. В. Багров, А. А. Байжуманов, А. П. Бонарцев, А. Р. Браже,
Н. А. Браже, В. К. Ванаг, П. В. Гулак, А. Н. Дьяконова, Д. В. Зленко,
И. Б. Коваленко, Н. А. Крупенина, А. В. Локтюшкин, О. Г. Лулева,
Е. Г. Максимов, П. А. Мамонов, Д. Н. Маторин, А. М. Нестеренко,
В. Н. Новоселецкий, В. А. Осипов, Е. Ю. Паршина, Г. Ю. Ризниченко,
А. Б. Рубин, А. А. Розенкранц, М. Г. Страховская, Ю. В. Храмцов,
А. А. Черкашин, К. В. Шайтан, А. О. Шумарина, А. И. Юсипович

Рецензенты:

д-р биол. наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета
МГУ имени М. В. Ломоносова Г. В. Максимов;
заместитель декана факультета наук о материалах МГУ,
член-корреспондент РАН Е. А. Гудилин

Нанобиотехнологии : практикум / под ред. А. Б. Рубина. —
Н25 М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — 384 с. : ил., [8+8] с.
цв. вкл. — (Нанотехнологии).

ISBN 978-5-9963-0627-5

Практикум по курсу «Нанобиотехнологии» разработан сотрудниками кафедры биофизики и биоинженерии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. Включает описание современных приборов (атомно-силовая микроскопия, конфокальная микроскопия, лазерная интерференционная микроскопия, спектроскопия КР и ЭПР) и методов моделирования, а также цикл лабораторных работ, посвященных применению наноструктур (квантовые точки, коллоидные частицы, липосомы) как для повышения эффективности биологического исследования, так и для обучения основам нанобезопасности.

УДК 57
ББК 28.07

Учебное издание

Серия: «Нанотехнологии»

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Практикум

Ведущий редактор канд. биол. наук *В. В. Гейдебреخت*

Художник *Н. А. Новак*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Компьютерная верстка: *Н. Ю. Федоровская*

Подписано в печать 11.08.11. Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 24. Тираж 500 экз. Заказ

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, http://www.Lbz.ru

ISBN 978-5-9963-0627-5

© БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Введение	5
Часть 1. Нанобиотехнологии в изучении биологических мембран	15
1.1. Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранно-связанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра. <i>Браже А. Р., Браже Н. А.</i>	15
1.2. Методы приготовления и анализа моноламеллярных липосом. <i>Паршина Е. Ю.</i>	43
1.3. Методы модификации состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов. <i>Браже Н. А., Лунева О. Г., Паршина Е. Ю.</i>	62
1.4. Проникновение метилвиологена в растительную клетку под действием возбуждения, вызванного электрическим стимулом. <i>Крупенина Н.</i>	81
1.5. Транспорт неэлектролитов через природные мембранные нанопоры. <i>Локтюшкин А. В.</i>	94
1.6. Основы атомно-силовой микроскопии. <i>Багров Д. В., Шайтан К. В.</i>	113
Часть 2. Действие нанообъектов на биологические структуры	140
2.1. Методы комплексного исследования действия нанообъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов. <i>Юсипович А. И.</i>	140
2.2. Модификация активности антиоксидантных ферментов крови наночастицами серебра <i>in vitro</i> . <i>Байжуманов А. А., Паршина Е. Ю.</i>	161

2.3. Определение эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET), ферстеровского радиуса и константы скорости переноса энергии от квантовых точек к биологическим акцепторам. <i>Максимов Е. Г.</i>	176
2.4. Изучение токсичности наноматериалов с использованием флуоресценции микроводорослей. <i>Осипов В. А., Маторин Д. Н.</i>	193
2.5. Влияние наночастиц серебра на структуру и функционирование нервных волокон. <i>Браже А. Р.</i>	217
Часть 3. Нанобиотехнологии в медицине	229
3.1. Исследование фотодинамического действия наночастиц сенситизаторов разных типов на микроорганизмы. <i>Шумарина А. О., Страховская М. Г.</i>	229
3.2. Применение явления поверхностного плазмонного резонанса для изучения межмолекулярных взаимодействий. <i>Гулак П. В., Розенкранц А. А.</i>	248
3.3. Изучение поверхности твердого тела и биологических объектов в воздушной и водной среде с нанометровым разрешением при помощи атомно-силовой микроскопии. <i>Храмцов Ю. В.</i>	270
3.4. Изучение фармакокинетических параметров наноразмерных лекарственных средств. <i>Бонарцев А. П.</i>	285
Часть 4. Теоретические аспекты нанобиотехнологии	299
4.1. Молекулярно-механическое моделирование свойств углеродных нанотрубок. <i>Зленко Д. В., Мамонов П. А., Нестеренко А. М.</i>	299
4.2. Современные методы моделирования белок-белковых взаимодействий. <i>Дьяконова А. Н., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Резниченко Г. Ю.</i>	316
4.3. Диссипативные структуры в реакции Белоусова—Жаботинского с реагентами, диспергированными в обращенной АОТ микроэмульсии. <i>Черкашин А. А., Ванаг В. К.</i>	348
4.4. Молекулярная динамика мембранных белков на примере адренорецептора. <i>Новоселецкий В. Н., Шайтан К. В.</i>	364

ПРЕДИСЛОВИЕ

На биологическом факультете Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова с 2008 г. ведется подготовка кадров по современным направлениям исследований в области нанобиотехнологий. Ученый совет биологического факультета МГУ на своем заседании 14 мая 2009 г. одобрил создание новой межкафедральной специализации «Нанобиоматериалы и нанобиотехнологии» для студентов 4–5 курсов. В этой работе принимают участие кафедры биофизики, биоинженерии, вирусологии, эмбриологии и генетики, а также ряд других факультетов: физический, химический, наук о материалах, биоинженерии и биоинформатики, фундаментальной медицины. Участие в научно-исследовательских разработках в сфере нанобиотехнологий требует от современного молодого специалиста, наряду с глубоким знанием своей узкой области, широкого научного кругозора, понимания основных проблем и подходов смежных наук — физики, химии, биологии, материаловедения, медицины. Поэтому при подготовке специалистов в этой области на биологическом факультете необходим выход за рамки не только отдельных кафедр, но и факультетов, обеспечивающий специалисту дополнительные знания и исследовательские навыки, требующиеся для работы по междисциплинарным направлениям.

Основные принципы подготовки специалистов в области нанотехнологий на биологическом факультете:

- Мультидисциплинарный характер образования, обеспечиваемый параллельным преподаванием фундаментальных основ составляющих дисциплин (математика, информатика, физика, химия, биология).
- Обеспечение постоянной связи учебного процесса как с фундаментальными научными исследованиями, ориентированными на понимание основ нанотехнологий, так и с решениями инженерных (прикладных) проблем с помощью нанотехнологий.

- Постоянный контакт с научно-исследовательскими и производственными учреждениями как необходимый элемент учебного процесса.
- Подготовка проводится с использованием современного научно-исследовательского и производственного оборудования в режиме модульного обучения. Она должна включать выполнение студентами курсовых, дипломных, магистерских проектов, а также защиту кандидатских диссертаций, в которых сочетаются фундаментальные и прикладные аспекты нанотехнологий, начиная с формулировки темы и целей исследования и методов выполнения работы.
- Внедрение современных методов обучения, включая дистанционное обучение и обучение на современном оборудовании в специальных центрах. На основе апробированных лекционных и семинарских курсов, опыта проведения практических занятий будут оперативно готовиться учебники, учебные и методические пособия, которые можно будет использовать для эффективного обучения молодых кадров в других российских вузах. На факультете создаются специальные курсы и практикумы, затрагивающие многие аспекты этой развивающейся отрасли фундаментальной, прикладной науки.

Представленное методическое пособие для практикума по курсу «нанобиотехнологии» разработано сотрудниками кафедры биофизики и биоинженерии биологического факультета. Оно включает описание современных приборов (атомно-силовая микроскопия, конфокальная микроскопия, лазерная интерференционная микроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) и ЭПР) и методов моделирования и цикл лабораторных работ, посвященных применению наноструктур (квантовые точки, коллоидные частицы, липосомы) для повышения эффективности биологического исследования. Пособие предназначено для студентов, магистров и аспирантов, специализирующихся в области нанотехнологий.

*М. П. Кирпичников,
академик РАН*

ВВЕДЕНИЕ

Первое упоминание о методах, которые впоследствии будут названы нанотехнологией, американская пресса связывает с известным выступлением Ричарда Фейнмана «Там внизу много места» (англ. «There's Plenty of Room at the Bottom») 29 декабря 1959 г. в Калифорнийском технологическом институте на ежегодной сессии Американского физического общества. В этой речи он пророчески заметил: «В 2000 г., когда оглянутся на эту эпоху, то удивятся, почему же на пороге 60-х никто серьезно не стал двигаться в этом направлении». Под «этим направлением», как принято считать, Фейнман имел в виду решение задачи манипулирования и управления объектами в очень малых масштабах. Собственно, именно эту программную речь Фейнмана и рассматривают чаще всего как начало истории нанотехнологий. Хотя справедливости ради надо отметить, что и изобретатели туннельного микроскопа Герд Биннинг и Генрих Рорер, и первый человек, который начал писать слова атомами на поверхности кристалла, Дон Эйглер, признались в своих интервью, что не знали об этой работе Фейнмана.

Впервые же термин «нанотехнология» употребил Норио Танигути в 1974 г. Он назвал так субмикронные технологии, которые в то время тоже считались фантастикой. Сам термин «нанотехнология» стал популярен после того, как в 1980-х годах Эрик К. Дрекслер широко использовал его в своих книгах: «Машины создания: грядет эра нанотехнологии» и «Наносистемы: Молекулярные машины, производство, и расчет». В этих книгах Дрекслер пытался представить, к чему приведет развитие новых технологий, создающих нанопроцессоры и наномашины. И надо заметить, что как раз благодаря выступлениям Эрика К. Дрекслера отцом нанотехнологии считают Ричарда Фейнмана. Нанотехнология — слово, состоящее из трех греческих слов: *nanos* (карлик) — дольная приставка,

обозначающая одну миллиардную часть, *techne* – искусство, мастерство и *logos* – учение. Термин практически не употреблялся до начала 1990-х годов, пока в Америке не начала работать программа под названием «Национальная нанотехнологическая инициатива». С этого времени, сначала американское, а затем японское и европейское научные сообщества начали связывать очередной прогресс сразу в нескольких дисциплинах с развитием нанотехнологий. Как в научной, так и в популярной литературе стали употреблять такие термины, как «наночастицы» (НЧ), «наноматериалы» и «нанотехнологии». Что же такое «наноструктуры», «наноматериалы» и «нанотехнологии»? Из-за чего к ним прикован такой интерес со стороны научного мира и идет значительное бюджетное финансирование исследований по этой теме во всем мире? Дело в том, что при уменьшении размеров вещества от «макросомеров» к размерам от 1 до 100 нм резко меняются его свойства — с увеличением поверхностной энергии изменяется его поверхностное натяжение, температуры плавления и структурных переходов, может измениться сама структура, электронные и оптические характеристики — то есть весь спектр физико-химических свойств, чего не наблюдается для веществ в макросостоянии.

Согласно определению Нобелевского лауреата Ж. И. Алферова, «если при уменьшении объема какого-либо вещества по одной, двум или трем координатам до размеров нанометрового масштаба возникает новое качество или это качество возникает в композиции из таких объектов, то эти образования следует отнести к наноматериалам, а технологии их получения и дальнейшую работу с ними — к нанотехнологиям».

В «Концепции развития в Российской Федерации работ в области нанотехнологий на период до 2010 года» (2004 г.) нанотехнология определяется как совокупность методов и приемов, обеспечивающих возможность контролируемым образом создавать и модифицировать объекты, включающие компоненты с размерами менее 100 нм, хотя бы в одном измерении, и в результате этого получившие принципиально новые качества, позволяющие осуществлять их интеграцию в функционирующие системы большего масштаба. Практический аспект нанотехнологий включает в себя производство устройств и их компонентов, необходимых для создания, обработки и манипуляции атомами, молекулами и НЧ.

Подразумевается, что не обязательно объект должен обладать хоть одним линейным размером менее 100 нм — это могут быть макрообъекты, атомарная структура которых контролируемо создается с разрешением на уровне отдельных атомов или которые содержат нанобъекты. В более широком смысле этот термин охватывает также методы диагностики и исследования таких объектов.

Нанотехнологии качественно отличаются от традиционных дисциплин, поскольку на таких размерах макроскопические технологии часто неприменимы, а микроскопические явления, роль которых пренебрежительно мала на привычных масштабах, становятся намного значительнее: свойства и взаимодействия отдельных атомов и молекул или агрегатов молекул (например, силы Ван-дер-Ваальса, квантовые эффекты).

Для изучения структуры нанобъектов в настоящее время используются различные виды микроскопии. Так с помощью сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) можно не только увидеть отдельные атомы, но также избирательно воздействовать на них, в частности перемещать атомы по поверхности. Например, в исследовательском институте IMRE в Сингапуре, последовательно перемещая атомы золота на поверхности кристалла золота, сотрудники смогли выложить слово NANO, используя 51 атом золота.

В настоящее время в исследовательских лабораториях применяют не только «классические» зондовые микроскопы, но и СЗМ в комплексе с флуоресцентной микроскопией, микроскопией комбинационного рассеяния света, конфокальной микроскопией, микроскопией с насыщением люминесценции, рентгеновской микроскопией, растровой сканирующей электронной микроскопией и др. Для создания НЧ выделяют два основных пути. Один хорошо известный — «сверху вниз», при котором используют диспергационные технологии для измельчения крупных частиц, другой — «снизу вверх», когда атомы и молекулы заставляют самоорганизовываться в упорядоченные структуры размером в несколько нанометров (золь-гель метод, криохимическая технология, синтез с использованием микроэмульсий и жидкокристаллических матриц, синтез в органических мицеллах). Частицы размерами от 1 до 100 нм обычно называют «наночастицами». Оказалось, что при уменьшении размера НЧ приобретают новые электрические и механические свойства, до этого им несвойственные. Так, например, выращен-

[. . .]

Часть 1

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

1.1. Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембраносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра

Аннотация задачи

Одним из актуальных направлений нанотехнологий является создание наночастиц (НЧ), используемых в биомедицинских исследованиях для усиления сигнала (интенсивности флуоресценции и комбинационного рассеяния (КР) света), регистрируемого от объектов: клеток, белков и нуклеиновых кислот, биологических мембран и низкомолекулярных компонентов клетки. В спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, англ. *SERS* — *surface enhanced Raman spectroscopy*) к объекту добавляют НЧ серебра или золота, реже — НЧ меди, палладия или сплава серебра с золотом, на поверхности которых возникают плазмонный резонанс и перенос заряда, что приводит к увеличению рамановского сечения исследуемых молекул более чем в 10^5 – 10^6 раз. Теоретически величина коэффициента усиления может достигать 10^{11} – 10^{14} , что позволит детектировать даже единичные молекулы. Упомянутые эффекты позволяют исследовать конформацию молекул при концентрации менее 10^{-6} – 10^{-8} М. Усиление сигнала КР на поверхности НЧ возникает только тогда, когда расстояние между НЧ и анализируемой молекулой составляет не более 15–20 нм, что дает возможность говорить о пространственной локализации молекулы.

Одно из самых перспективных направлений спектроскопии ГКР — исследование локализации и конформации молекул внутри живых клеток, прикрепленных к подложке с нанесенными

наноструктурами из серебра или золота, или внутри живых клеток, к которым добавлен раствор с НЧ серебра или золота.

Наглядным примером демонстрации применения спектроскопии ГКР для исследования конформации и свойств молекул в составе живых клеток являются эритроциты. Основное содержимое эритроцитов — гемоглобин, который условно можно разделить на две фракции: цитоплазматический $\text{Гб}_{\text{ц}}$, находящийся в цитоплазме, и мембранносвязанный $\text{Гб}_{\text{мс}}$, связанный на плазматической мембране на цитоплазматическом домене белка полосы 3 (анионного обменника АЕ1). Гемопорфирин гемоглобина обладает интенсивным комбинационным рассеянием, зависящим от конформации самого гема и глобина — белковой части Гб. В настоящее время единственным способом для исследования конформации и O_2 -связывающих свойств $\text{Гб}_{\text{мс}}$ в интактных эритроцитах является метод спектроскопии ГКР. Добавление коллоидного раствора серебра к разбавленному раствору эритроцитов приводит к сорбции наночастиц серебра (НЧС) на поверхность клеток, а плазмонный резонанс, возникающий на поверхности НЧ, приводит к многократному усилению сигнала КР от $\text{Гб}_{\text{мс}}$. При использовании НЧС сигнал КР от цитоплазматического гемоглобина практически не усиливается, поскольку весь $\text{Гб}_{\text{ц}}$ находится в цитоплазме эритроцита на глубине более 15 нм. При этом концентрация $\text{Гб}_{\text{мс}}$ в эритроцитах слишком мала, чтобы можно было регистрировать его сигнал КР без НЧС. Таким образом, методом спектроскопии ГКР с НЧ серебра для разбавленных суспензий эритроцитов можно исследовать конформацию и свойства $\text{Гб}_{\text{мс}}$, а методом традиционной спектроскопии резонансного и нерезонансного КР можно исследовать конформацию и свойства $\text{Гб}_{\text{ц}}$ в интактных эритроцитах.

Цель работы: освоение методов спектроскопии гигантского и традиционного резонансного и нерезонансного комбинационного рассеяния в применении к эритроцитам и сравнительное исследование конформации и кислород-связывающих свойств $\text{Гб}_{\text{мс}}$ и $\text{Гб}_{\text{ц}}$ в интактных эритроцитах.

Объекты исследования: эритроциты крысы и изолированный цитоплазматический гемоглобин.

Методы: спектроскопия ГКР с использованием коллоидного раствора серебра, традиционная спектроскопия КР и абсорбционная спектроскопия.

План работы

- Получение коллоидного раствора серебра путем восстановления AgNO_3 гидросиламином гидрохлоридом и нахождение оптимальных условий реакции. Контроль качества полученного коллоидного раствора НЧС по спектрам поглощения коллоидного раствора.
- Определение оптимальных концентрации эритроцитов в исследуемой пробе и соотношения объемов суспензии эритроцитов и коллоидного раствора серебра для получения максимального сигнала ГКР от гемоглобина в эритроцитах. Обоснование требований к оптимальным условиям, при которых коллоидный раствор серебра не влияет на свойства эритроцитов.
- Регистрация спектров ГКР эритроцитов при их различных концентрациях в суспензии и разных соотношениях объемов суспензии эритроцитов и коллоидного серебра.
- Применение традиционной спектроскопии КР для изучения конформации и свойств Gb_c в интактных эритроцитах и сравнение спектров ГКР и КР.
- Выделение Gb_c из эритроцитов и определение оптимальных условий ГКР спектроскопии для исследования изолированного Гб. Сопоставление спектров ГКР от эритроцитов и изолированного Гб.
- Применение различных алгоритмов для обработки КР и ГКР спектров и вычитания базовой линии.
- Выводы по проделанной работе.

Предполагаемые результаты и навыки

- Освоение методики приготовления коллоидного раствора серебра, приводящего к усилению сигнала КР от гемоглобина в составе эритроцитов и изолированного Гб.
- Освоение методов спектроскопии ГКР и КР в применении к эритроцитам и изолированному гемоглобину.
- Приобретение навыков анализа спектров КР и ГКР гемоглобина с использованием различного программного обеспечения.
- Приобретение навыков оценивания изменений конформации Гб и его O_2 -связывающих свойств по спектрам КР и ГКР.

Полученные результаты продемонстрируют зависимость конформации и свойств Гб от места его локализации в клетке. Задача ознакомит нанотехнологов, физиков и химиков с особенностями применения НЧ в спектроскопии ГКР для исследования свойств живых клеток, а биологов — с возможностью получать дополнительную информацию о структуре и свойствах биомолекул при использовании НЧ серебра или золота.

Оценка итогов проведенного практикума

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

- 1) краткое теоретическое введение с описанием изучаемого объекта и указанием преимуществ спектроскопии КР и ГКР для исследования объекта;
- 2) четко сформулированные цели и задачи исследования;
- 3) описание основных методов исследования;
- 4) корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и их обсуждение;
- 5) четкие выводы по полученным результатам;
- 6) список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами беседу, в которой студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. Как вариант сдачи задачи возможен устный доклад студента с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

Организация задачи

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2–3 человек. Группа работает под руководством одного преподавателя и выполняет отдельное исследование, которое может производиться как независимо, так и в рамках цикла задач. Местом проведения являются лаборатории кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

В работе используется следующее оборудование:

- 1) КР-спектрометр с лазерами 473 и 532 нм (Ciel, Eurolase), системой регистрации МОРС 1/3648 (Троицк, Россия), сделанной на базе линейной ПЗС TCD1304DG (Toshiba, Япония) с фильтрами LPO2-473RS-50 и LPO3-532RS-25 (Shemrock, США);
- 2) центрифуга Laborfuge 400R производства фирмы «Thermo Scientific» или MiniSpin Plus производства фирмы «Eppendorf»;
- 3) вортекс «Bio Vortex V1» производства фирмы «Biosan»;
- 4) магнитная мешалка MSH 300 производства фирмы «Biosan»;
- 5) рН-метр рН410 производства фирмы «Аквилон»;
- 6) Спектрофотометр Hitachi (Япония).

Описание задачи

Введение

Эритроциты являются одним из самых распространенных объектов в биомедицинских исследованиях и диагностических тестах. Основная функция эритроцитов — перенос кислорода (O_2). При этом O_2 -транспортная функция эритроцитов зависит от конформации и свойств гемоглобина (Гб) — его сродства к O_2 . В течение длительного времени основным методом исследования сродства Гб к O_2 была абсорбционная спектроскопия, при помощи которой регистрируют кривые насыщения Гб кислородом. Однако этот метод не позволяет получить детальной информации о конформационных перестройках в Гб, которые и лежат в основе изменений O_2 -транспортной функции Гб. Кроме того, методом абсорбционной спектроскопии нельзя исследовать свойства Гб_{мс} в интактных эритроцитах, поскольку его количество составляет не более 0,5% от содержания Гб_ц и поэтому не детектируется по спектрам поглощения. В настоящее время единственным методом, позволяющим оценивать конформацию и O_2 -связывающие свойства Гб_{мс} в интактных эритроцитах, является спектроскопия ГКР.

Гб может взаимодействовать с двумя участками мембраны: липидным матриксом и цитоплазматическим доменом белка полосы 3 (он же АЕ1 обменник). По всей видимости, присоединение Гб к липидной части мембраны происходит только при патологиях эритроцитов в тех случаях, когда происходит «обнажение» липидов от подмембранного цитоскелета или когда особым специфици-

ческим образом изменяется конформация Гб. Таким образом, весь связанный на мембране Гб представляет собой Гб_{мс}, взаимодействующий с белком полосы 3. Учитывая толщину плазматической мембраны, приблизительный диаметр цитоплазматических участков трансмембранных белков, а также размер белков цитоскелета, получается, что на расстоянии 10–20 нм от поверхности эритроцита локализован только Гб_{мс}, в то время как Гб_ц расположен дальше в цитоплазме (рис. 1).

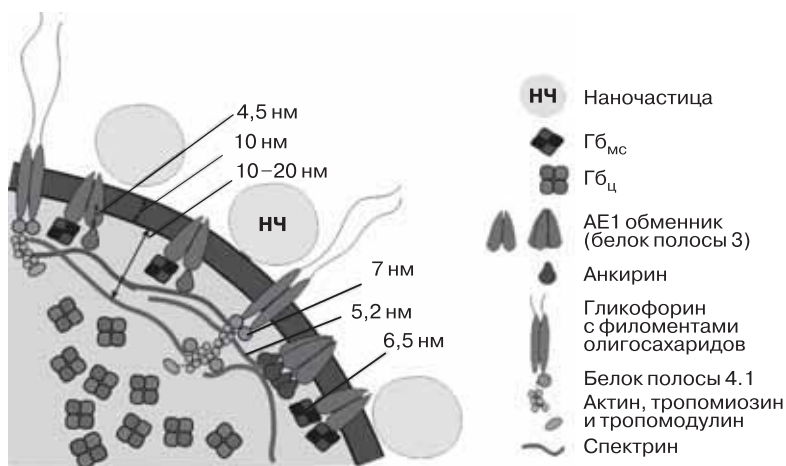


Рис. 1. Схематическое изображение эритроцита в примембранной области с трансмембранными белками, цитоскелетом, Гб_ц и Гб_{мс}, а также наночастицами (НЧ), взаимодействующими с поверхностью эритроцита (Brazhe et al., 2009) (См. цветную вклейку 1, рис. 1)

Усиление сигнала КР с помощью НЧС или НЧЗ вследствие плазмонного резонанса происходит в том случае, когда расстояние между молекулой, комбинационно рассеивающей свет, и поверхностью НЧ составляет не более 10–20 нм (Moskovits, 1985; Wang et al., 2003; Wokaun et al., 1983). Таким образом, при использовании метода спектроскопии ГКР с добавлением НЧС или НЧЗ к суспензии эритроцитов усиливается сигнал КР в большей степени от Гб_{мс}. При помощи традиционной спектроскопии КР регистрируется сигнал КР только от Гб_ц в эритроцитах, поскольку Гб_{мс} в силу своей низкой концентрации дает лишь очень слабый и нерегистрируемый сигнал КР. Таким образом, для полного

детального исследования конформации и свойств Гб_{мс} и Гб_ц в эритроцитах можно использовать спектроскопии ГКР и КР.

Исследование свойств Гб_{мс} в интактных эритроцитах представляет большой интерес, поскольку существуют данные, показывающие, что способы регуляции сродства к O₂ могут отличаться для свободного (цитоплазматического) и мембранносвязанного Гб. Так, для изолированного Гб методом абсорбционной спектроскопии показано, что добавление полипептида — участка цитоплазматического домена АЕ1 обменника — уменьшает чувствительность Гб к концентрации ионов H⁺ и 2,3-дифосфоглицерату, которые являются модуляторами сродства Гб к O₂. Кроме того, «патологические» формы Гб (с нарушенной структурой гема, измененным взаимодействием между субъединиц и проч.) накапливаются в примембранной области и, следовательно, спектроскопия ГКР может быть использована для выявления ранних нарушений структуры и свойств Гб в эритроцитах.

В данной задаче предлагается провести сравнительное исследование конформации и O₂-связывающих свойств Гб_{мс} и Гб_ц эритроцитов с использованием коллоидного раствора серебра и возбуждении КР гемоглобина при помощи двух возбуждающих лазеров с длинами волн 473 и 532 нм.

Материалы и методы

Материалы

- NaCl, KCl, Na₂HPO₄×12H₂O, NaH₂PO₄×2H₂O, CaCl₂, MgSO₄, хлороформ, глюкоза, гепарин (Sigma, USA или отечественного производства, градации не ниже ч. д. а.);
- AgNO₃, чистота 99,9999%, гидраксиламин гидрохлорид (NHCl) (наиболее высокая степень очистки), NaOH (Sigma, США);
- вода MilliQ.

Растворы

В работе используются изотонический физиологический раствор — буфер Алена — и гипертонический раствор, приготовленный путем увеличения концентраций солей буфера Алена в 1,67 раза.

Изотонический буфер Алена, mM: 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgSO₄, 4 Na₂HPO₄×12H₂O, 1 NaH₂PO₄×2H₂O, 10 глюкозы. На

[. . .]

Работа в области нанобиотехнологий требует понимания основных проблем и подходов многих смежных наук – физики, химии, биологии, материаловедения, медицины и др. Данное методическое пособие разработано сотрудниками кафедры биофизики и биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. Оно включает описание современных приборов (атомно-силовая микроскопия, конфокальная микроскопия, лазерная интерференционная микроскопия, спектроскопия КР и ЭПР) и методов моделирования, а также цикл лабораторных работ, посвященных применению наноструктур (квантовые точки, коллоидные частицы, липосомы) для повышения эффективности биологического исследования. Читатели изучают биомолекулярные наноконплексы, их свойств, распределение и характерные размеры, получают знания о конформации молекул в этих комплексах.

Книга удачно структурирована: авторы систематизировали и распределили материал по четырем основным направлениям – нанобиотехнологии в изучении биологических мембран, действие нанообъектов на биологические структуры, нанобиотехнологии в медицине и теоретические вопросы нанобиотехнологии. Каждая задача описана по единому плану, что позволяет читателю легко освоить теорию метода и устройство основных приборов, а также ответить на контрольные вопросы.

Для студентов и аспирантов, специализирующихся в области нанотехнологий.