

биологии и медицины

Б. НОЛТИНГ

Новейшие
методы
исследования
биосистем

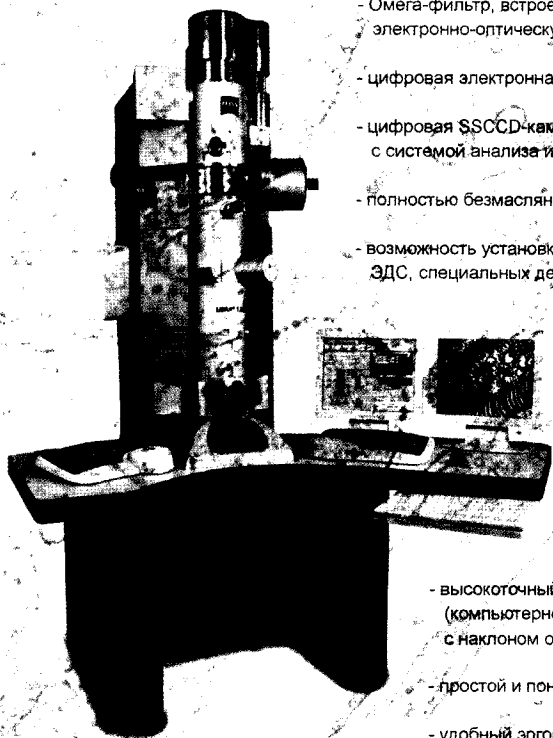


ТЕХНОСФЕРА

αvo

Электронная микроскопия от Carl Zeiss

Серия ZEISS LIBRA 120 - Новый стандарт
в просвечивающей электронной микроскопии.



- система освещения по Келеру
- Омега-фильтр, встроенный в электронно-оптическую колонну
- цифровая электронная оптика
- цифровая SSCCD-камера высокого разрешения с системой анализа изображений
- полностью безмасляная вакуумная система
- возможность установки крио-, сканирующих приставок, ЭДС, специальных детекторов и держателей

- высокоточный гониометрический столик
(компьютерное управление по 5 осям)
с наклоном от +75° до -75°

- простой и понятный интерфейс управления
- удобный эргономичный дизайн рабочего места оператора

ООО "Карл Цейсс"

105 005 Москва
Денисовский пер., 26
Тел.: (095) 771 64 90
Факс: (095) 771 64 90
E-mail: office@zeiss-msk.ru

www.zeiss.ru



We make it visible.



МИР биологии и медицины

Б. НОЛТИНГ

Новейшие
методы
исследования
биосистем

Перевод с английского
Н. Н. Хромова-Борисова

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2005

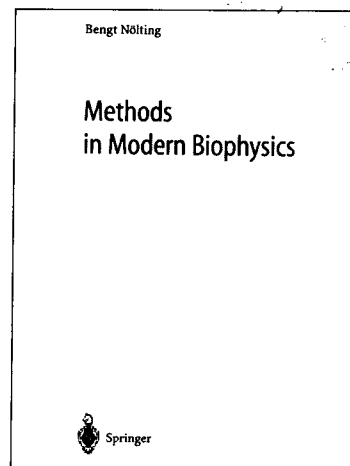
αVO

Б. Нолтинг
Новейшие методы исследования биосистем
Москва:
Техносфера, 2005. — 256 с. ISBN 5-94836-044-X

Книга охватывает широкий круг методов, таких как молекулярная динамика, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, рентгено-структурный анализ, инфракрасная спектроскопия, просвечивающая и растровая электронная микроскопия, биофизические нанотехнологии, протеомика.

Монография насыщена новейшими примерами применения этих методов: дистанционный контроль состояния атмосферы и лесов, определение вредных веществ в окружающей среде, токсичных (и нетоксичных) биоматериалов и агентов (вирусы, бактерии, отдельные молекулы), диагностика болезней, управление качеством в пищевой и фармацевтической промышленности, поиски внеземной жизни, определение мутаций на уровне ДНК, секвенирование ДНК и белков, идентификация белков, изучение конформационных превращений молекул ферментов и выявление роли отдельных аминокислотных остатков и степени гидратации в процессе образования их комплексов с субстратами и в ходе ферментационного катализа, исследования процесса сворачивания молекул белка, белок-белковых взаимодействий и самосборки надмолекулярных комплексов и т.п.

Книга будет полезна студентам и преподавателям вузов, медикам и биологам, физикам и химикам, токсикологам, экологам, физиологам, биофизикам, биохимикам.



© 2004, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
 © 2005, ЗАО «РИЦ «Техносфера»
 перевод на русский язык,
 оригинал-макет, оформление.

ISBN 94836-044-X
ISBN 3-540-01297-4 (англ.)

Содержание

Предисловие к изданию на русском языке	6
Предисловие автора	9
Ключевые слова	11
Сокращения и обозначения	12
ГЛАВА 1. ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ	15
1.1. Структура нативного состояния	15
1.2. Переходные состояния при сворачивании белковой молекулы	24
1.3. Структурные детерминанты констант скоростей укладки	27
1.4. Имитационное моделирование укладки белка	34
Примечание переводчика	37
ГЛАВА 2. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БИОМОЛЕКУЛ	39
2.1. Ионообменная хроматография	39
2.2. Гель-фильтрация	44
2.3. Аффинная хроматография	37
2.4. Противоточная хроматография и ультрафильтрация	49
ГЛАВА 3. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ	53
3.1. Принципы работы и типы спектрометров	53
3.1.1. Секторный масс-спектрометр	54
3.1.2. Квадрупольный масс-спектрометр	55
3.1.3. Масс-спектрометр с ионной ловушкой	56
3.1.4. Времяпролетный масс-спектрометр	56
3.1.5. Масс-спектрометр с преобразованием Фурье	60
3.1.6. Ионизация, транспорт и детекция ионов	61
3.1.7. Фрагментация ионов	62
3.1.8. Сочетание с хроматографическими методами	63
3.2. Практические применения	66
ГЛАВА 4. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ	76
4.1. Преобразование Фурье	76
4.2. Рентгеновская кристаллография белков	85
4.2.1. Предыстория	85
4.2.2. Получение подходящих кристаллов	85
4.2.3. Получение дифракционной картины	88
4.2.4. Определение фаз: включение тяжелых атомов	94
4.2.5. Вычисление электронной плотности и установление структуры	102

4.2.6. Криокристаллография и времяразрешающая кристаллография	102
4.3. Рассеяние рентгеновых лучей	103
4.3.1. Малоугловое рассеяние рентгеновых лучей	103
4.3.2. Обратное рассеяние рентгеновых лучей	107
ГЛАВА 5. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БЕЛКОВ	109
5.1. Спектрометры и приспособления	110
5.1.1. Сканирующие инфракрасные спектрометры	110
5.1.2. Инфракрасные спектрометры с преобразованием Фурье	111
5.1.3. Лидар, оптическая когерентная томография, аттенуированное полное отражение и ИК-микроскопы	115
5.2. Практические применения	121
ГЛАВА 6. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ	125
6.1. Просвечивающий электронный микроскоп	125
6.1.1. Принцип действия	125
6.1.2. Разрешение	127
6.1.3. Источники электронов	128
6.1.4. Сетчатые подложки	130
6.1.5. Электронные линзы	131
6.1.6. Взаимодействие электронов с образцом и электронная микроскопия	133
6.1.7. Примеры биофизических применений	137
6.2. Сканирующий просвечивающий электронный микроскоп	138
ГЛАВА 7. СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ	140
7.1. Атомно-силовой микроскоп	140
7.2. Сканирующий туннельный микроскоп	152
7.3. Сканирующий ближнепольный оптический микроскоп	155
7.3.1. Преодоление ограничений классической оптики	155
7.3.2. Конструкция апертуры для субдлинноволновой оптики	159
7.3.3. Примеры применения СБОМ	163
7.4. Микроскоп, сканирующий ионную проводимость, сканирующий тепловой микроскоп и другие зондовые сканирующие микроскопы	163
ГЛАВА 8. БИОФИЗИЧЕСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ	167
8.1. Измерение сил в одиночных белковых молекулах	167
8.2. Измерение сил в одиночном комплексе ДНК с ДНК-полимеразами	170
8.3. Молекулярное узнавание	172
8.4. Белковые наночипы и белковая инженерия	175
8.5. Изучение и манипуляции с растущими кристаллами белков	178
8.6. Нанотрубки, молекулярные диоды, самоорганизующиеся нанотранзисторы, трансфекция наночастицами и прочие биофизические нанотехнологии	179

ГЛАВА 9. ПРОТЕОМИКА: ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ	185
9.1. Обнаружение мишеней	186
9.2. Протеомный анализ молекулярных взаимодействий	188
9.3. Химическая протеомика	192
9.4. Технология «лаборатории на чипе» и масс-спектрометрические сканеры	193
9.5. Структурная протеомика	194
ГЛАВА 10. СПЕКТРОМЕТРИЯ ИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ	196
10.1. Основная конструкция спектрометров	196
10.2. Разрешающая способность и чувствительность	202
10.3. «Нюхатели» на основе СИП	206
10.4. Детали конструкции	205
10.5. Обнаружение биологических агентов	215
ГЛАВА 11. АКУСТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИКРОВОЛН И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕДАЧИ МЫСЛЕЙ	219
11.1. Теоретическое обоснование	219
11.1.1. Основная концепция технологии передачи мыслей	221
11.1.2. Описание технологии	221
11.1.2.1. Частоты	223
11.1.2.1. Источники излучения	224
11.2. Примеры возможных применений	225
11.2.1. Автоматические устройства	225
11.2.2. Переносные устройства	226
11.2.3. Биомедицинская микроволновая акустика и передача мыслей	227
ГЛАВА 12. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	233
ДОПОЛНЕНИЕ	234
Использование просвечивающей и растровой электронной микроскопии в биологии и медицине	234
Просвечивающая электронная микроскопия	235
Растровая электронная микроскопия	249

Предисловие к изданию на русском языке

Публикуя перевод книги Бенгта Нолтинга, издательство «Техносфера» продолжает издание новейшей литературы по наиболее актуальным проблемам науки и техники, в частности по такой революционизирующей и бурно развивающейся отрасли научных разработок, как нанотехнология. Еще несколько лет назад нанотехнология казалась плодом неумной фантазии ограниченного числа энтузиастов. Сейчас — это многообещающая реальность. Уместно напомнить, что отечественная наука и инженерия занимают ведущие мировые позиции в практической реализации таких технологий. Ясно, что пропаганда знаний в этой области будет способствовать притоку к этим исследованиям и разработкам свежих сил пылливой и творческой молодежи нашей страны. Предлагаемая вниманию читателей книга Нолтинга займет одно из достойнейших мест в череде других наших изданий.

В оригинале настоящее руководство носит излишне расплывчатое название «Методы современной биофизики». Очевидно, что в книге такого объема невозможно осветить все необъятное многообразие существующих методов современной биофизики. По согласованию с автором и издательством Springer, русский перевод книги выходит под названием «Новейшие методы исследования биосистем».

В десяти главах автор излагает основные принципы нескольких наиболее плодотворных и перспективных ключевых технологий исследования биосистем, а также устройство соответствующих приборов и впечатляющие «свежие» примеры научных достижений, получаемые с их помощью, и яркое разнообразие их применения на практике.

На первом месте среди них стоит сочетание тонких экспериментальных методов анализа с имитационным моделированием для решения труднейшей задачи молекулярной биологии — механизма сворачивания (фолдинга) белковой молекулы. В последующих 4-х главах излагаются такие «старинные» технологии анализа биосистем, как основные методы хроматографии (ионообменная, гель-фильтрационная, аффинная, противоточная и ультрафильтрация), масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ, ИК-спектрометрия и электронная микроскопия. Однако автор показывает, что все они переживают в настоящее время ренессанс и обогатились изощренными новшествами, которые резко повысили их разрешающую способность. Фантастические, кружащие голову, успехи достигнуты в области сканирующей зондовой микроскопии с ее широким арсеналом технических реше-

ний, таких как атомно-силовые, туннельные, ближнепольные оптические, тепловые и прочие сканирующие зондовые микроскопы (СЗМ). Если еще недавно удавалось манипулировать под микроскопом отдельными клетками, то теперь с помощью СЗМ возможно реально манипулировать отдельными биомакромолекулами и их комплексами, определять силы взаимодействий в них и между ними, манипулировать ростом белковых кристаллов и т. п. Запредельная, немыслимая ранее, разрешающая способность достигается с помощью новейшей спектроскопии ионной подвижности (СИП). С помощью «электронных носов» («нюхателей»), созданных на основе СИП, удастся обнаружить микроскопические, следовые количества, вплоть до единичных микрочастиц и молекул опасных биологических и химических агентов в тысячах литров прокачиваемого атмосферного воздуха. Две главы — восьмая и девятая — посвящены новейшим достижениям бионанотехнологии и протеомики, которые пока еще очень слабо освещены в отечественной литературе.

Завершается книга обоснованием смелых идей о возможности передачи мыслей с использованием известного явления, называемого микроволновым акустическим эффектом, и о его использовании в медицинских целях и для исследования мозга. Автор использует метафору «передача мыслей» с явно провокационной рекламной целью, на самом деле, конечно же, речь не идет о телепатии, а всего лишь о преобразовании голосовых сигналов в направленные модулированные микроволновые сигналы, которые способны вызывать специфические акустические эффекты и реакции у воспринимающего их человека.

Особо эвристически ценным представляется обширный список литературы, в котором подавляющее большинство источников датируются годами нового тысячелетия. Приятно, что автор подошел к составлению этого списка достаточно объективно и среди цитированных авторов нередко русские фамилии. Некоторые дополнительные отечественные источники добавлены переводчиком по согласованию с автором книги. Ввиду значительного объема библиографии, приведенной автором в английском издании, с ней можно ознакомиться на веб-сайте Б. Нолтинга (см. ниже).

Книга Б. Нолтинга является уникальным иллюстрированным введением в новейшие биофизические технологии; она богато иллюстрирована более чем 260 рисунками и схемами.

Все изложение описанных автором технологий проникнуто духом гуманизма. Большой упор в книге делается на демонстрацию их реальных и высокоэффективных применений при решении задач биологической и химической безопасности и защиты здоровья человека и окружающей среды. Здесь и поиски внеземной жизни, и дистанционный контроль биосферы Земли, определение выбросов в окружающую среду вредных веществ и биоматериалов (вирусы, бактерии, отдельные молекулы), диагностика болезней, управление качеством в пищевой и фармацевтической промышленности и проч. По-видимому, автор не

преследовал цели акцентировать внимание читателя на этих приложениях, и поэтому мы сочли целесообразным ввести короткий раздел «Ключевые слова», из которого читатель сможет оценить масштабность таких применений обсуждаемых в книге технологий.

Издательство и переводчик признательны автору за разъяснение некоторых спорных аспектов книги и за предоставление новейших ссылок. Дополнительные материалы доступны на его сайте.

Книга Б. Нолтинга несомненно будет полезна самому широкому кругу читателей, всем, кто интересуется новейшими достижениями молекулярной биологии и их практическими применениями, как профессионалам, так и пытливым и любознательным: студентам, учителям и преподавателям вузов, медикам и биологам, физикам и химикам, токсикологам, экологам, физиологам, биофизикам, биохимикам, инженерам-приборостроителям, а также научным работникам силовых структур и спецслужб.

Н.Н. Хромов-Борисов

Литература

Брандон Д., Каплан В. Микроструктура материалов. Методы исследования и контроля. — М.: Техносфера, 2004.

Варадан В., Виной К., Джозе К. ВЧ МЭМС и их применение. — М.: Техносфера, 2004.

Миронов В. Основы сканирующей зондовой микроскопии. — М.: Техносфера, 2004.

Пул Ч.П. мл., Оуэнс Ф.Дж. Нанотехнологии. — М.: Техносфера, 2004.

Розеншер Э., Винтер Б. Оптоэлектроника. — М.: Техносфера, 2004.

Харрис П. Углеродные нанотрубы и родственные структуры. Новые материалы XXI века. — М.: Техносфера, 2004.

Вэб-сайт автора книги Бенгта Нолтинга. URL: <http://www.pitb.de/nolting/>.

Предисловие автора

В последние годы мы наблюдаем необыкновенно возросший интерес к биофизическим методам, применяемым для изучения структурно-функциональных отношений в белках, клеточных органеллах, клетках и частях тела. От биофизики ожидают ответов на многие животрепещущие вопросы: каковы факторы, которые ограничивают физические и умственные способности человека, и как мы могли бы эти способности улучшить. В настоящее время растущее разнообразие новых методов, их высочайшая производительность и запредельная разрешающая способность позволяют изучать мистерии жизни на молекулярном уровне. Примерами могут служить рентгеноструктурный анализ, сканирующая зондовая микроскопия и нанотехнология. С помощью рентгеноструктурного анализа установлена структура ошеломляюще большого количества молекулярных комплексов. Сканирующая зондовая микроскопия и нанотехнология позволяют проводить испытания механических свойств индивидуальных биомолекул. С помощью сканирующей ближнеполевой оптической микроскопии преодолен предел разрешения классической оптики Аббе-Фурье и удастся наблюдать объекты с разрешением в области 200 нм. Электронная микроскопия заполняет брешь между методами с молекулярным разрешением и с клеточным разрешением. Другие методы, такие как протеомика, масс-спектрометрия и спектрометрия ионной подвижности, помогают нам изучать высоко гетерогенные смеси и понимать чрезвычайно сложные биологические явления, такие как, например, функции мозга человека. Применение этих физических и биофизических методов в сочетании со множеством других междисциплинарных подходов дает нам детальное механистическое понимание биологических процессов и болезненных состояний, что в дальнейшем поможет найти рациональные пути такой переделки биологических процессов, которая лишит их негативных побочных эффектов. Такое знание поможет нам преодолеть пропасть между человеком и машинами и найти новые средства излечения болезней и преодоления наших несовершенств.

Данная книга написана в основном для студентов, аспирантов, стажеров, исследователей, лекторов и профессоров в области биофизики и биохимии. Но также и для обучающихся и специалистов в области структурной и молекулярной биологии, медицинской физики, биотехнологии, природоохранных наук и биофизической химии. За основу взят курс лекций «Биофизические методы», которые автор читал, будучи приглашенным профессором в Венском технологическом университете (Vienna University of Technology). В книге представлены из-

бранные методы биофизики, которые получили наибольшее развитие и применение в самые последние годы.

Глава 1 водит читателя в фундаментальные проблемы структуры белков. Белки эволюционировали в высоко специфичные и оптимизированные молекулы и, кроме того, их можно рассматривать как класс биомолекул, которые приобрели наибольшее разнообразие функций. Воистину познание биологических систем во многом зависит от понимания структуры белков, механизмов их образования и их функции. В следующей главе (гл. 2) представлены наиболее важные хроматографические методы для разделения, выделения и очистки белков и других биомолекул. Без таких процедур невозможно большинство дальнейших биофизических исследований, и их оптимизация помогает сэкономить массу времени. Масс-спектрометрия (гл. 3) незаменима как для контроля качества препаратов биомолекул, так и во многих других аналитических применениях. Главы 4—7 сосредоточены на методах химического и структурного анализа биомолекул. Рентгеновская кристаллография (разд. 4.1.2) возможно обладает наивысшей разрешающей способностью для определения структуры больших биомолекул и биомолекулярных комплексов. Однако для ее применения требуется приготовление кристаллов высокого качества. Более дешевой является инфракрасная спектроскопия, ее исполнение более легкое и быстрое (гл. 5). Наиболее пригодной для структурных исследований сложных биологических систем типа клеток, клеточных органелл и крупных молекулярных комплексов несомненно является электронная микроскопия (гл. 6). Различные типы сканирующих зондовых микроскопов способны генерировать изображения геометрических, механических, электрических, оптических или термических свойств биологических образцов при субнанометровом разрешении (гл. 7). В главе 8 («Биофизическая нанотехнология») мы знакомимся с новейшими методами для механического исследования индивидуальных биомолекул и для конструирования новых нанотехнологических структур и устройств. В следующих двух главах (гл. 9 «Протеомика» и гл. 10 «Спектрометрия ионной подвижности») изложены два новейших типа аналитических методов, с помощью которых можно эффективно исследовать комплексные образцы, такие как клетки человека или бактерии. Наконец в последней главе (гл. 11) излагаются некоторые новейшие разработки, касающиеся взаимодействия электромагнитного излучения с человеком. В книге не обсуждаются кинетические методы биофизики, поскольку им посвящена недавняя монография автора «Кинетика сворачивания белков» (Nölting, 1999b). Читатель может обратиться к этой книге для получения более подробной информации о структуре белка, теории переходного состояния в науке о белке и о различных кинетических методах для определения структурных изменений в белках и других биомолекулах.

Ключевые слова

Атомно-силовой микроскоп	Ориентирование в пространстве
Аффинная хроматография	Нанотехнологии
Белковая инженерия	Нейронные сети
Белковые микрочипы	Нюхатели
Биологическая безопасность	Передача мыслей
Биологические агенты	Поиски внеземной жизни
Биосистемы	Преобразования Фурье
Биотерроризм	Приборостроение
Биофизика	Протеомика
Внеземная жизнь	Противоточная хроматография
Времяпролетные масс-спектрометры	Рентгеноструктурный анализ
Гель-фильтрационная хроматография	Рост кристаллов
Грипп	Сибирская язва
Дистанционный контроль окружающей среды	Сканирующая зондовая микроскопия
ИК-спектроскопия	Сканирующие ИК-спектрометры
Имитационное моделирование	Сканирующие ближнепольные оптические микроскопы
Катастрофы	Сканирующие туннельные микроскопы
Коровье бешенство	Спектрометрия ионной подвижности
Лаборатория на чипе	Томография
Лидары	Ультрафильтрация
Марс	Фолдинг белка
Марсоход	Хроматография
Масс-спектрометрия	Чрезвычайные ситуации
Микроскопия	Чума
Микроволновые акустические эффекты	Экологический мониторинг
Микрочипы	Электронная микроскопия
Молекулярное узнавание	VIP-персоны

Сокращения и обозначения

Единицы измерения и физические константы

Å	—	ангстрем (10^{-10} м; 0,1 нм)
°C	—	градусы Цельсия
c	—	скорость света в вакууме ($2,99792 \times 10^8$ м/с)
СТР	—	параметр топологии цепи — (chain topology parameter)
e	—	элементарный заряд ($1,6022 \times 10^{-19}$ Ку)
h	—	постоянная Планка ($6,6261 \times 10^{-34}$ Дж·с)
k_B	—	постоянная Больцмана ($1,3807 \times 10^{-23}$ Дж/К)
m_e	—	масса покоя электрона ($9,1094 \times 10^{-31}$ кг)
M_w	—	молекулярная масса
pI	—	изоэлектрическая точка
Да	—	дальтон (г/моль)
кВ	—	киловольт
кДа	—	кило-Дальтон (кг/моль)
кДж	—	килоджоуль (1 кДж = 240 кал)
л	—	литр (10^{-3} м ³)
мВ	—	милливольт (10^{-3} В)
мкм	—	микрометр (микрон — 10^{-6} м)
мкс	—	микросекунда (10^{-6} с)
мл	—	миллилитр (10^{-6} м ³)
мМ	—	миллимоль ($6,0221 \times 10^{20}$ /л)
моль	—	$6,0221 \times 10^{23}$
МОм	—	мегаом (10^6 В/А)
Н	—	ньютон (кг·м/с ²)
нА	—	наноампер (10^{-9} А)
нм	—	нанометр (10^{-9} м)
пг	—	пикограмм (10^{-12} г)
п. н.	—	пара нуклеотидов (bp — base pair)
пН	—	пиконьютон (10^{-12} кг·м/с ²)
эВ	—	электрон-вольт ($1,6022 \times 10^{-19}$ Дж)

Сокращения

АСМ	—	атомно-силовой микроскоп (AFM — atomic force microscope)
АТФ	—	аденозинтрифосфат (ATP — adenosine triphosphate)
АЦП	—	аналого-цифровой преобразователь (ADC - analog-to-digit converter)
БКЯ	—	болезнь Кройцфельда-Якоба (CJD — Creutzfeldt-Jacob disease)
БПОМ	—	ближнепольный оптический микроскоп (NSOM — near-field optical microscope)
БСА	—	бычий сывороточный альбумин (BSA — bovine serum albumin)
ВП-МС	—	времяпролетный масс-спектрометр (time-of-flight MS — TOF-MS)
ВЭЖХ	—	высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC — high pressure liquid chromatography и FPLC — fast performance liquid chromatography)
ГХ	—	газовая хроматография (GC — gas chromatography)
днДНК	—	двунитевая ДНК (dsDNA — double-stranded DNA)
ДНК	—	дезоксирибонуклеиновая кислота (DNA — deoxyribonucleic acid)
ДТГС	—	дейтерированный триглицин сульфат (DTGS — deuterated triglycine sulfate)
ДЭАЭ	—	диэтиламиноэтил (DEAE — diethyl-amino-ethyl)
ДСК	—	дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC - differential scanning calorimetry)
дЦТФ	—	2'-дезокситидин-5'-трифосфат (dCTP — 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate)
ИГЭ	—	инфекционная губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота или «синдром коровьего бешенства» (BSE — bovine spongiform encephalopathy)
ИИУ	—	инерционное измерительное устройство (IMU — inertial measurement unit)
ИК	—	инфракрасный (IR — infrared)
ИКС-ПФ	—	инфракрасный спектрометр с преобразованием Фурье (FTIR)
КД	—	круговой дихроизм (CD — circular dichroism)
КМ	—	карбоксиметил (CM — carboxy methyl)
ЛД	—	линейный дихроизм (LD — linear dichroism)
Лидар	—	прибор светового обнаружения и оценки дальности (LIDAR — light detection and ranging)
МС-ПФ	—	масс-спектрометр с преобразованием Фурье (FTMS — Fourier transform MS)
ОКТ	—	оптическая когерентная томография (ОСТ — optical coherence tomography)
онДНК	—	однонитевая ДНК (ssDNA — single-stranded DNA)
ОРС	—	открытая рамка считывания (ORF — open reading frame)
ПВХ	—	поливинилхлорид

ПЗС	— прибор с зарядовой связью (CCD — charge coupled device)
ПТФЭ	— политетрафторэтилен
ПФ	— преобразование Фурье (FT — Furier transform, Furier transformation)
ПЦР	— полимеразная цепная реакция (PCR — polymerase chain reaction)
ПЭМ	— просвечивающий электронный микроскоп (TEM — transmission electron microscope)
СБОМ	— сканирующий ближнепольный оптический микроскоп (SNOM — scanning near-field optical microscope)
СЗМ	— сканирующий зондовый микроскоп (SPM — scanning probe microscope)
СИП	— спектрометр ионной подвижности (IMS — ion mobility spectrometer)
СОКТ	— спектральная оптическая когерентная томография (SDOCT — spectral domain optical coherence tomography)
СПЭМ	— сканирующий просвечивающий электронный микроскоп (STEM — scanning transmission electron)
СТеМ	— сканирующий тепловой микроскоп (SThM — scanning thermal microscope)
СТМ	— сканирующий туннельный микроскоп (STM — scanning tunneling microscope)
СОП	— система ориентирования в пространстве (GPS)
ТГС	— триглицинсульфат
ТНТ	— тринитротолуол (TNT — trinitrotoluene)
ЦНС	— центральная нервная система (CNS — central nervous system)
ЯМР	— ядерный магнитный резонанс

ГЛАВА 1

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

1.1. Структура нативного состояния

Тело человека содержит поразительно большое количество различных типов белков (около 100 000¹). Белки являются «умными» молекулами, которые исполняют весьма специфические функции, такие как высокоэффективный катализ биохимических реакций, мышечное сокращение, механическая стабильность тела, перенос (транспорт) веществ в организме и регуляция генов. Для оптимального осуществления таких функций в ходе длительной эволюции путем естественного отбора создались (отобрались) высоко специфические белковые структуры. Жизнедеятельность человека, животных и растений решающим образом зависят от целостности этих структур. Даже небольшие нарушения структуры белка могут снизить жизнедеятельность организма, а в худшем случае — привести к смертельным болезням.

Белки обычно состоят из тысяч атомов, таких как водород (H), углерод (C), азот (N), кислород (O) и сера (S). Их ван-дер-ваальсовы радиусы суть примерно: 1,4 Å для H, 2,1 Å для —CH₃, 1,8 Å для N, 1,7 Å для O и 2,0 Å для S. Типичные размеры белковых молекул варьируют от нескольких нанометров до 200 нм. Графические изображения, на которых представлены все атомы в молекуле (рис. 1.1, а) или только ее осто́в (скелет) (рис. 1.1, б), для большинства белков оказываются ненаглядными. Поэтому общепринятыми становятся ленточные диаграммы (схемы), на которых осто́в молекулы белка изображается с помощью лент трех типов (рис. 1.1, в).

Различают несколько уровней структурной организации белковых молекул (см.² Nölting, 1999b³). Основополагающей является *первичная*

¹ По современным оценкам число генов в геноме человека составляет примерно 30 000 (здесь и далее сноски принадлежат переводчику).

² Здесь и далее «см.» означает «смотри, например», т. е. автор цитирует работы выборочно, по своему усмотрению. В большинстве случаев это наиболее характерные отобранные им (чаще всего новейшие) примеры.

³ Здесь и далее автор предпочитает самоцитирование, однако необходимые сведения можно найти во многих современных руководствах по структуре и химии белков. Отечественные источники и новейшие статьи добавлены переводчиком, по согласованию с автором, в конце главы.

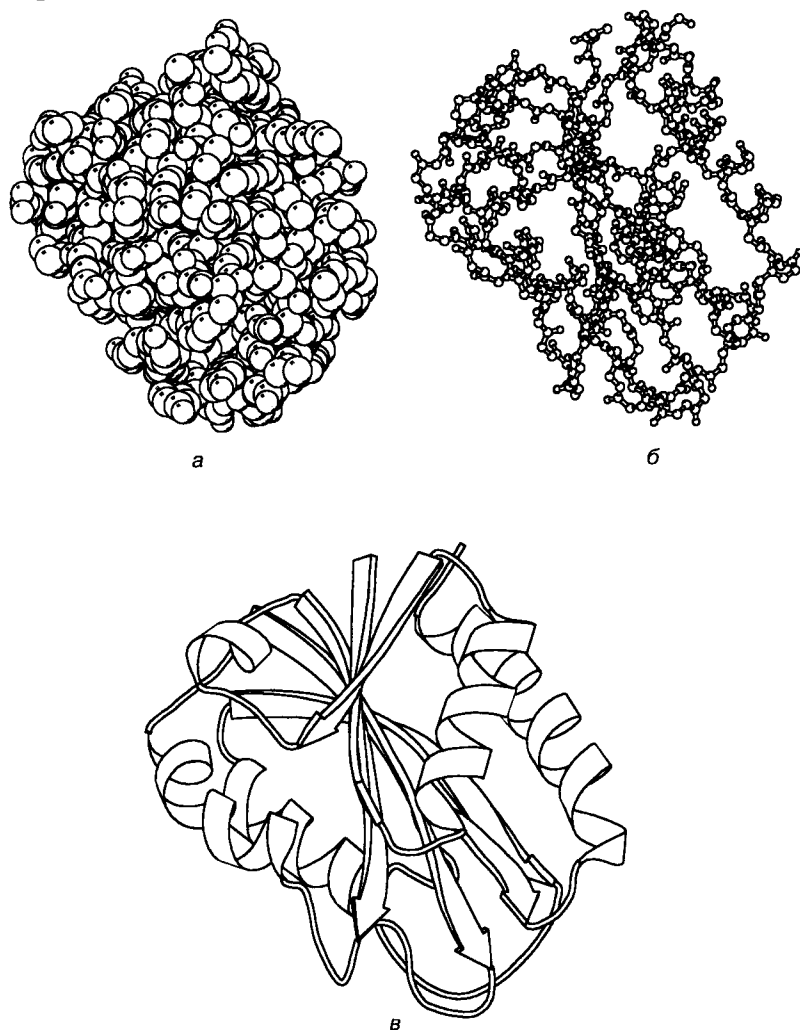


Рис. 1.1. Трехмерная структура флаводоксина из *Escherichia coli*, седловидного белка, переносящего электроны (Hoover, Ludwig, 1997): *a* — представление полной структуры молекулы с помощью объемных атомно-молекулярных моделей; *б* — представление белкового остова с помощью каркасных (шарико-стержневых) моделей; *в* — ленточное представление: ленты, стрелки и линии символизируют, соответственно, α -спирали, β -тяжи и β -изгибы. Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Брукгейвенской национальной лаборатории (Abola et al., 1997). Изображения созданы с помощью программы MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

структура, которая есть последовательность аминокислотных остатков. 20 канонических аминокислот, входящих в состав белков, можно разделить на три группы: неполярные, полярные и заряженные. Некоторые физические свойства аминокислот представлены в табл. 1.1⁴. Сведения о гидрофобности аминокислот см. в Nölting (1999b²). Типичные белки содержат 50—1000 аминокислотных остатков. Интересным исключением является титин — белок, найденный в скелетных мышцах, одиночная цепь которого состоит примерно из 27 000 аминокислотных остатков. Следующий уровень — *вторичная структура*; к ней относят некоторые общие регулярные структуры (конформации) остова полипептидной цепи. Существуют три основных типа вторичной структуры: *спирали* (α -спирали), *листы* (складчатые или рифленые листы, образуемые β -тяжами) и *изгибы* (β -изгибы). Те вторичные структуры, которые нельзя отнести ни к одному из этих трех типов, обычно называют «случайными (неупорядоченными) клубками» или просто «другими». Длинные связи между α -спиралями и β -структурами, которые являются нерегулярными структурами, часто называют «петлями» или « β -изгибами». Третий уровень — *третичная структура* — отражает информацию о трехмерном расположении элементов вторичной структуры в одиночной (автономной) белковой молекуле или в субъединице. Третичная структура белковой молекулы (или субъединицы) есть расположение в пространстве всех ее атомов, безотносительно к взаимодействию с соседствующими молекулами (или субъединицами). Это определение подразумевает, что белки могут состоять из субъединиц. Каждая субъединица состоит из одной полипептидной цепи и может содержать кофакторы. Наконец, *четвертичная структура* есть расположение субъединиц в пространстве с образованием контактов между субъединицами, безотносительно к внутренней геометрии субъединицы. Обычно субъединицы образуют четвертичную структуру путем нековалентных ассоциаций. Дисульфидные мостики и химические линкеры между субъединицами являются редкими исключениями.

Большинство белков обладают небольшой устойчивостью в пределах 20—60 кДж · моль⁻¹ и могут претерпевать конформационные превращения (Nölting, 1999b). Небольшие обратимые конформационные изменения в субнанометровом масштабе происходят очень часто. Обратимые или необратимые взаимоперемещения частей молекулы на субнанометровые или нанометровые расстояния необходимы для функционирования многих белков. Иногда, однако, белки ошибочно сворачиваются в ненативную конформацию. Для организма это может быть чревато драматическими последствиями, особенно если непра-

⁴ По согласованию с автором, в табл. 1.1 добавлены общепринятые трех- и однобуквенные обозначения для аминокислот (поскольку они нужны для лучшего понимания приводимых далее примеров: рис. 1.11, *г*, 1.12, *а*, 3.30, 3.31) и данные о гидрофобности аминокислотных остатков, взятые из работы (Финкельштейн, 1999—2000).

вильно свернутый белок накапливается в клетке. Хорошо известным примером такого процесса являются прионы (рис. 1.2 и 1.3; Riek et al., 1996, 1998; Hornemann, Glockshuber, 1998). Согласно гипотезе «только белок» (Prusiner, 1999) модифицированная форма нативного прионного белка может инициировать инфекционные нейродегенеративные болезни, такие как одна из форм слабоумия под названием болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD — БКЯ) у человека и инфекционная губчатая (спонгиформная) энцефалопатия или «синдром коровьего бешенства» у крупного рогатого скота (BSE — ИГЭ).

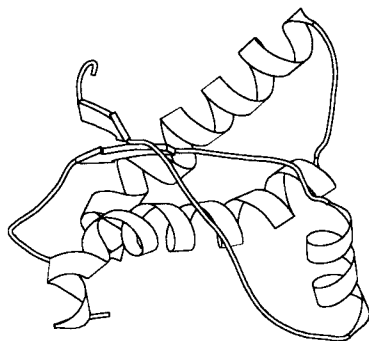


Рис. 1.2. Структура фрагмента прионного белка мыши PrP (121–231) (Rieck et al., 1996). Представленная вторичная структура состоит из двух β -тяжей (стрелки), трех α -спиралей (ленты) и пяти клубков (линии). Изображение создано с помощью программы MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

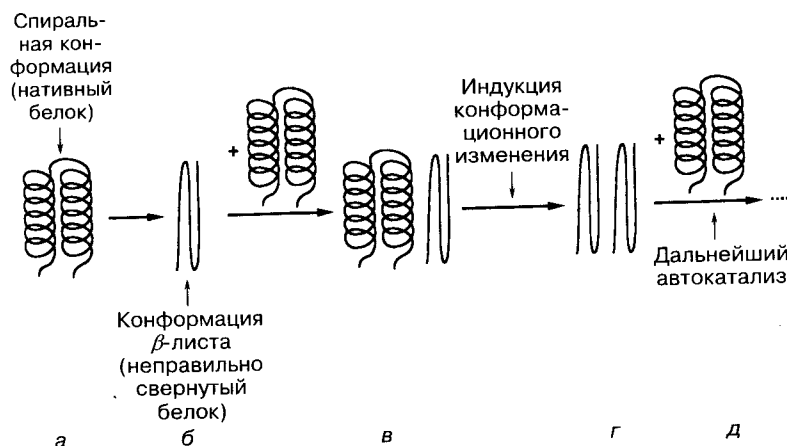


Рис. 1.3. Гипотетический механизм автокаталитического неправильного свертывания белка. С низкой скоростью нативная α -спиральная конформация (а) спонтанно превращается (неправильно сворачивается) в β -тяжевую конформацию (б); контакт неправильно свернутого белка с другими правильно свернутыми молекулами (в) катализирует их дальнейшее неправильное сворачивание (г, д).

Таблица 1.1. Физические свойства природных аминокислот

Аминокислота	Обозначение ^а		Молекулярная масса, (Да) ^а	Парциальный молярный объем, (см ³ моль ⁻¹) ^с	Парциальный молярный объем остатка в белке, (см ³ моль ⁻¹) ^б	Гидрофобность ^д , $\Delta G_{\text{вод}} \rightarrow \text{сверх боковой группы при 25}^\circ\text{C}$ (ккал/моль) ^д
	Трехбуквенное	Однобуквенное				
Аланин	Ala	A	89,09	60,4	54,7	−0,4
Аргинин	Arg	R	174,20	126,9	121,2	+1,5
Аспарагин	Asp	N	132,12	77,3	71,6	+0,8
Аспарагиновая кислота	Asn	D	133,10	74,3	68,6	+1,1
Валин	Val	V	117,15	90,8	85,1	−2,4
Гистидин	His	H	155,16	98,8	93,1	−0,2
Глицин	Gly	G	75,07	43,2	37,5	0
Глутамин	Gln	Q	146,15	93,9	88,2	+0,3
Глутаминовая кислота	Glu	E	147,13	89,7	84,0	+0,9
Изолейцин	Ile	I	131,17	105,6	99,9	−1,6
Лейцин	Leu	L	131,17	107,7	101,9	−2,3
Лизин	Lys	K	146,19	111,4	105,7	+1,5
Метионин	Met	M	149,21	105,4	99,6	−1,6
Пролин	Pro	P	115,13	82,2	74,8	−1,0
Серин	Ser	S	105,09	60,7	55,0	+0,1
Тирозин	Tyr	Y	181,19	123,7	118,0	−1,3
Треонин	Thr	T	119,12	76,9	71,1	−0,3
Триптофан	Trp	W	204,23	143,9	138,2	−3,0
Фенилаланин	Phe	F	165,19	121,8	116,1	−2,4
Цистеин	Cys	C	121,16	73,5	67,7	−2,1

^а (Coligan et al., 1996; Dawson et al., 1969; Nölting, 199b; Richards, 1974).

^б При 25°C в воде (Kharakoz, 1989, 1991, 1997).

^с Для стандартного цвиттер-ионного состояния.

^д I.I. Fauchere, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* (1983) 18:369.

^е Сокращенные обозначения аминокислотных остатков и данные о гидрофобности взяты из работы (Финкельштейн, 1999—2000) и добавлены, по согласованию с автором.

У растворимых белков гидрофильные боковые цепи аминокислотных остатков (аспарагиновой и глутаминовой кислот, аргинина, аспарагина, глутамина) стремятся располагаться преимущественно на поверхности молекулы. Гидрофобные боковые цепи аминокислотных остатков (аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, триптофана) располагаются преимущественно внутри так называемого гидрофобного ядра (кора или сердцевина) (рис. 1.4). В противоположность им мембранные белки часто содержат гидрофобные лоскуты (patches) (рис. 1.5).

Примеры удивительного разнообразия третичной структуры белков показаны на рис. 1.6—1.8. Многие белки образуют очень сложные мультимерные структуры. В гл. 6 на рис. 6.18 показан пример такого сложного ансамбля — белок GroEL. Дальнейшие подробности о структуре белков см. в книге (Nölting, 1999b⁶).

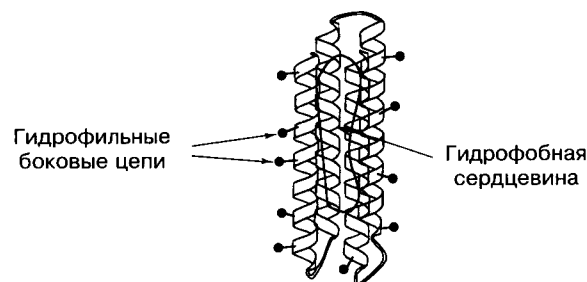


Рис. 1.4. В растворимых белках заряженные и полярные боковые цепи располагаются преимущественно на их поверхности. Боковые цепи гидрофобных аминокислотных остатков не любят находиться в водном окружении. Вот почему эти боковые цепи преимущественно прячутся внутри гидрофобной сердцевины (ядра, кора).

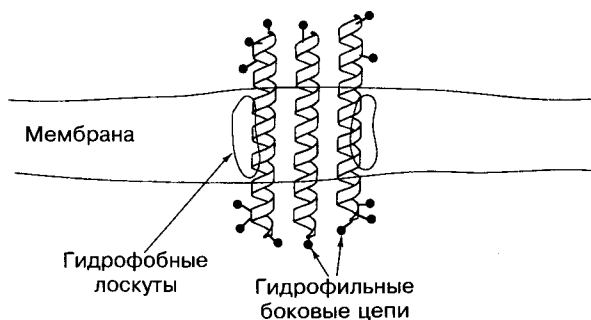


Рис. 1.5. Типичное распределение гидрофобных и гидрофильных боковых цепей в мембранных белках. Боковые цепи гидрофобных аминокислотных остатков преимущественно запрятаны внутри липидной части мембраны. Гидрофильные боковые цепи контактируют преимущественно с массой воды вне мембраны.

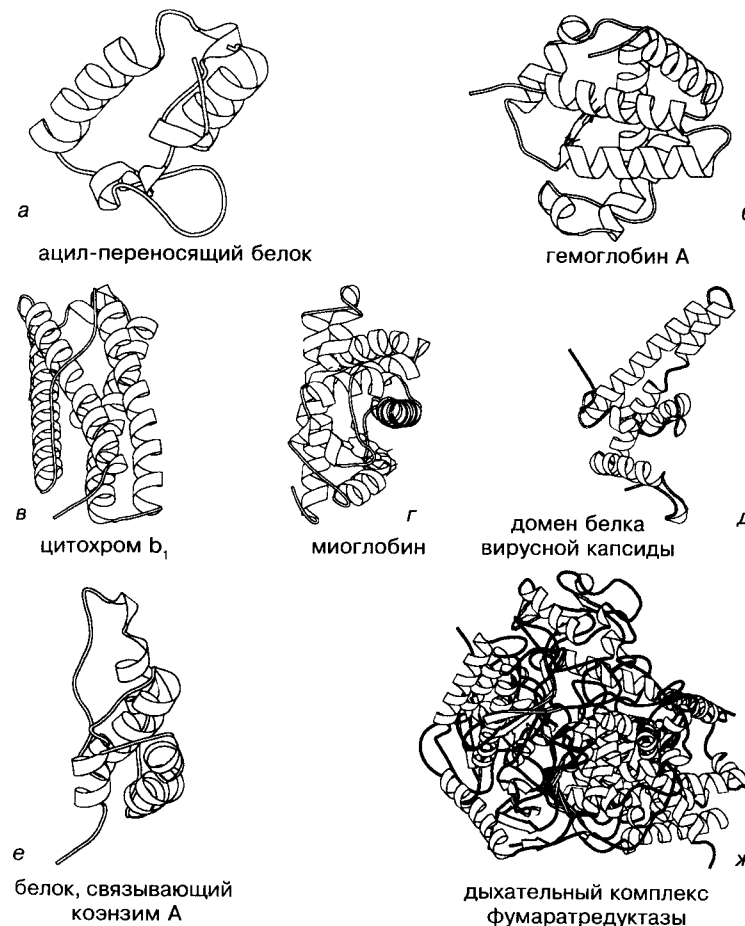


Рис. 1.6. Примеры белков с преимущественно α -спиральной вторичной структурой:

a — 1ACP: ацил-переносящий белок (Kim, Prestegard, 1990); *б* — 1HBB: гемоглобин А человека (Fermi et al., 1984); *в* — 1BCF: цитохром b_5 (железонакапливающий и электронпереносящий бактериоферритин) (Frolow et al., 1994); *г* — 1MGN: миоглобин спермы кита (Phillips et al., 1990); *д* — 1QGT: домен сборки белка капсиды вируса гепатита В человека (Wynne et al., 1999); *е* — 2ABD: белок, связывающий ацилкоэнзим А (Andersen, Poulsen, 1992); *ж* — 1FUM: фумаратредуктазный дыхательный комплекс *Escherichia coli*, включающий флавопротеиновую субъединицу фумаратредуктазы, фумаратредуктазный железосерный белок, фумаратредуктазный гидрофобный белок 15-кДа и фумаратредуктазный гидрофобный белок 13-кДа (Iverson et al., 1999). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Бруксгейвской национальной лаборатории (Abola et al., 1997). Изображения созданы с помощью программы MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

⁶ См. сноску 2 на стр. 15.

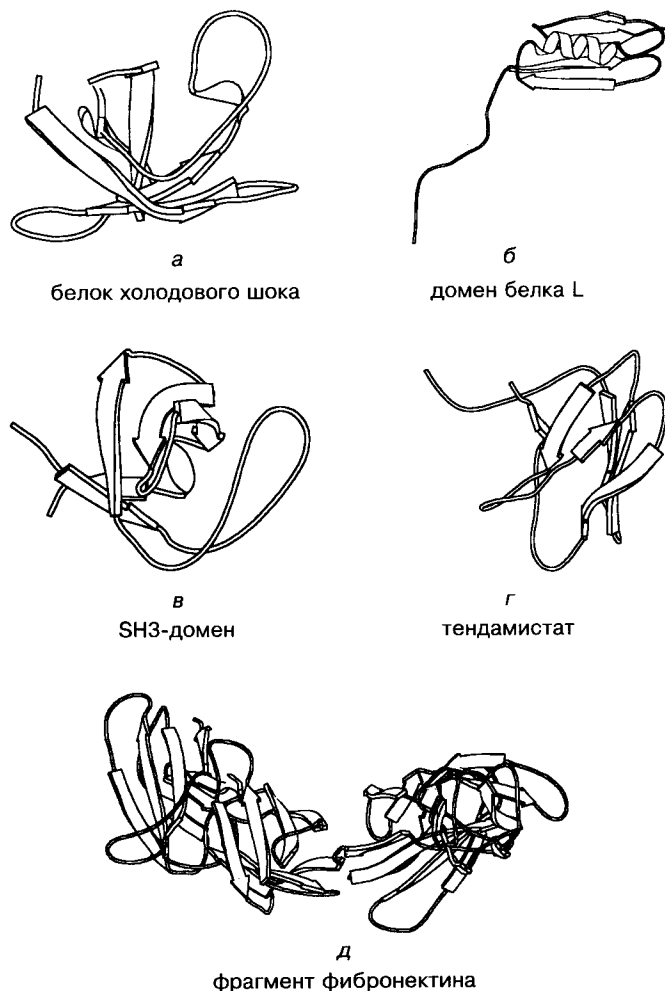


Рис. 1.7. Примеры белков с преимущественно β -листовой вторичной структурой:

а — 1CSP: главный белок холодного шока (CSPB) из *Bacillus subtilis* (Schidelin et al., 1993); б — 2PTL: домен белка L, связывающего легкую цепь иммуноглобулина (Wikström et al., 1995); в — 1NYF: домен SH3 из тирозинкиназы протоонкогена fyn (Morton et al., 1996); г — 2AIT: тендамистат — ингибитор α -амилазы (Kline et al., 1988); д — 1FNF: фрагмент фибронектина типа III человека (Leahy et al., 1992). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Бруксгейвской национальной лаборатории (Abola et al., 1997). Изображения созданы с помощью программы MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

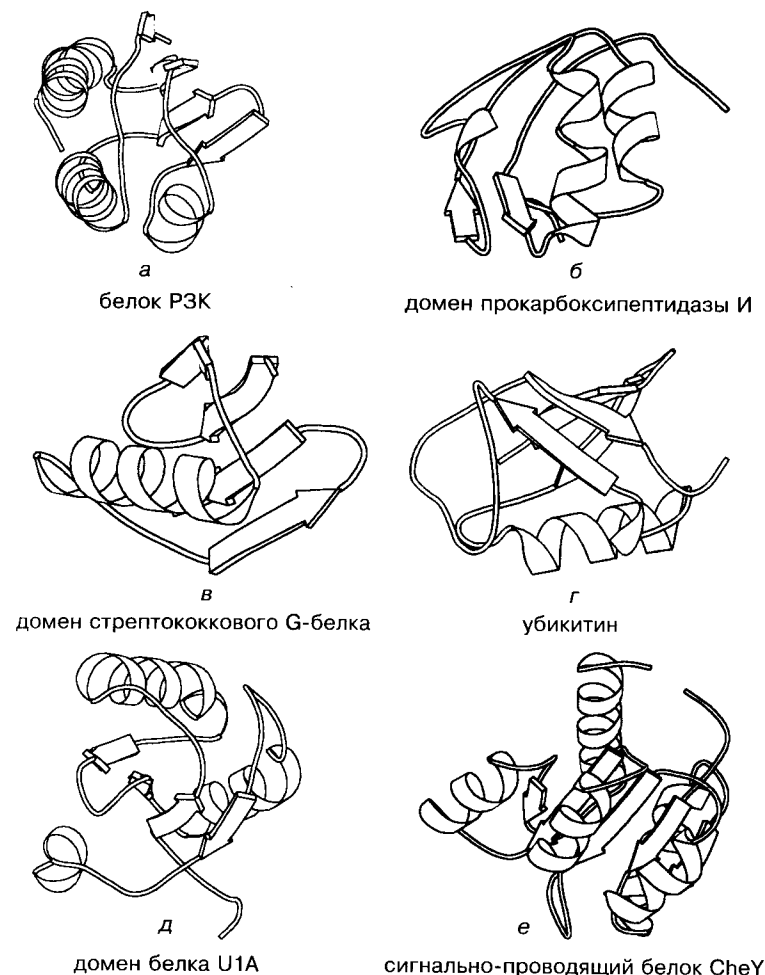


Рис. 1.8. Примеры белков со значительным количеством α -спиралей, и β -структур:

а — 1HDN: гистидин-содержащий белок-переносчик фосфата (van Nuland et al., 1994); б — 1PBA: активационный домен прокарбоксипептидазы B (Vendrell et al., 1991); в — 1PGB: домен стрептококкового G-белка, связывающий иммуноглобулин (Gallagher et al., 1994); г — 1UBQ: убикитин эритроцитов человека (Vijay-Kumar et al., 1987); д — 1URN: PNHK-связывающий домен сплайсосома белка U1A, образующий комплекс со шпилькой PNHK (Oubgidge et al., 1994); е — 3CHY: сигнально-проводящий белок CheY (Volz, Matsumura, 1991). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Бруксгейвской национальной лаборатории (Abola et al., 1997). Изображения созданы с помощью программы MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

1.2. Переходные состояния при сворачивании белковой молекулы⁷

Выявлению переходных (промежуточных) состояний при свертывании (укладке) белка посвящено значительное число работ (см. Nölting, 1999b). Структурой промежуточного состояния укладки называют такую структуру, которая образуется на стадии, лимитирующей скорость процесса (реакции) укладки. При этом в качестве начальной структуры в реакции образования нативной конформации обычно рассматривают развернутую полипептидную цепь. Знание структуры промежуточных состояний важно для понимания высокой эффективности таких реакций. Структура переходных состояний, выявленная у многих мономерных, а также некоторых димерных и мультимерных белков, свидетельствует в пользу механизма укладки, подобного реакции нуклеации — конденсации при кристаллизации, т. е. механизма, при котором «рост» структуры белка начинается с образования диффузно сворачивающегося ядра (или «зародыша»), катализирующее дальнейшее образование нативной структуры (Nölting, 1999b).

Рис. 1.9, а—г на примере четырех белков демонстрирует, как происходит закрепление (консолидация, т. е. «затвердевание») структуры промежуточных состояний. На этих картах величина Φ является вероятностью (или мерой прочности) образования контактов между аминокислотными остатками в соответствующих положениях полипептидной цепи⁸. Например, большие закрашенные кружки, расположенные по диагонали, указывают на консолидацию контактов во вторичных структурах, а большие закрашенные кружки под диагональю указывают на консолидацию контактов в третичных структурах (Nölting, 1998). Высокое разрешение структуры основных промежуточных состояний при образовании нативной структуры этих четырех небольших мономерных белков (домен белка src SH3, ингибитор 2 химотрипсина, барстар⁹, барназа¹⁰) и димерного репрессора Arg (здесь не показан) ясно показывает, что большинство частей каждой белковой молекулы, которые консолидируются в промежуточном состоянии, в третичной структуре объединяются в кластеры, и эти кластеры содержат значи-

⁷ В русских текстах термин folding переводится как «сворачивание», «свертывание», «укладка», либо используется калька «фолдинг» (Мюльберг, 2004). В зависимости от контекста мы будем использовать их как взаимозаменяемые синонимы.

⁸ См. примечание переводчика в конце данного параграфа.

⁹ Барстар — ингибитор барназы.

¹⁰ Барназа — внеклеточная рибонуклеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*.

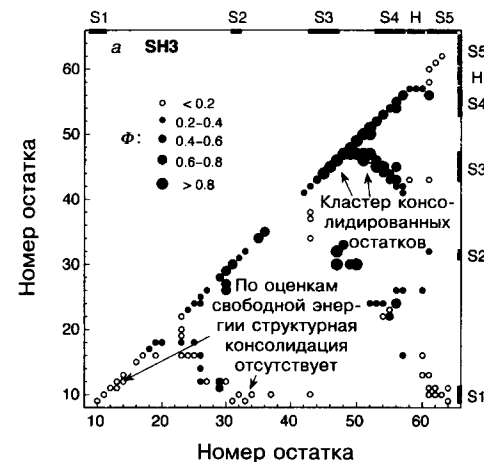


Рис. 1.9, а. Карта контактов между аминокислотными остатками для основного переходного состояния домена мономерного белка src SH3 (Nölting, Andert, 2000). Размеры и окрашенность кружков указывают степень структурной консолидации, измеренной в единицах так называемого Φ -значения (Nölting, 1999b). Кружки на диагонали графика соответствуют контактам во вторичных структурах, а контакты в третичных структурах соответствуют кружкам под диагональю. Обычно высокие значения Φ (крупные закрашенные кружки) указывают на высокую степень консолидации структуры и энергии взаимодействия, близкую к нативной. Значения $\Phi \approx 0$ (мелкие незакрашенные кружки) указывают на практическую невозможность образования стабильной структуры между аминокислотными остатками в индивидуальных позициях первичной последовательности. Умеренные значения $\Phi \approx (0,2-0,8)$ отражают различные вероятности консолидации структуры. Поскольку в переходном состоянии существует возможность ненативных взаимодействий, то только кластеры из нескольких контактов (при $\Phi \approx 0,5$ и для, по меньшей мере, 5 контактов) можно использовать для того, чтобы сделать статистически значимые выводы о присутствии или отсутствии значимой степени структурной консолидации. Положения α -спиралей и β -структур в нативном состоянии показаны жирными полосами на границах диаграммы: полосы H1, H2, ..., и полосы S1, S2, ..., соответственно.

тельно более высокий процент остатков, принадлежащих регулярной вторичной структуре, чем остальные остатки (Nölting, Andert, 2000¹¹). Для многих мономерных и некоторых димерных белков поразитель-

¹¹ Препринт этого обзора свободно доступен на сайте автора: <http://www.pitb.de/nolting/prot00/index.html>.

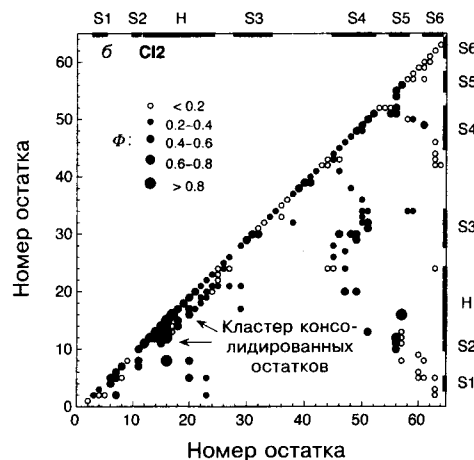


Рис. 1.9, б. Карта контактов между аминокислотными остатками для основного переходного состояния ингибитора химотрипсина 2 (CI2) (Nölting, Andert, 2000). Размеры и окрашенность кружков указывают степень структурной консолидации, измеренной в единицах так называемого Φ -значения (Nölting, 1999b). Остальные пояснения см. в подписи к рис. 1.9, а.

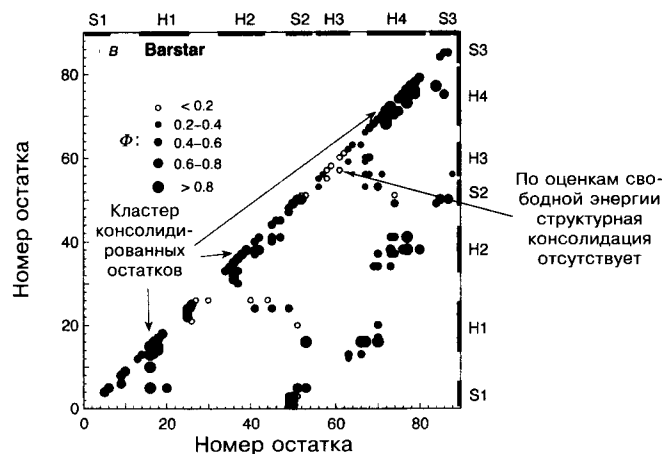


Рис. 1.9, в. Карта контактов между аминокислотными остатками для основного переходного состояния барстара (Nölting, Andert, 2000). Размеры и окрашенность кружков указывают степень структурной консолидации, измеренной в единицах так называемого Φ -значения (Nölting, 1999b). Остальные пояснения см. в подписи к рис. 1.9, а.

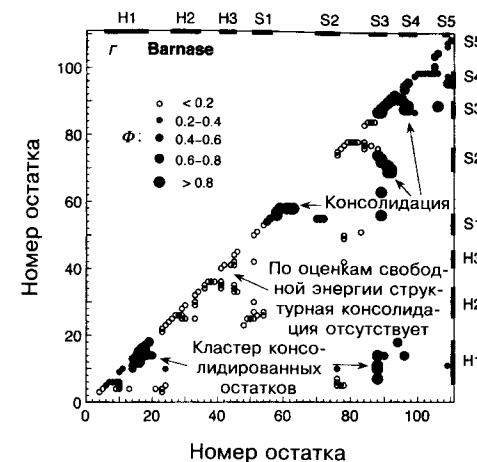


Рис. 1.9, г. Карта контактов между аминокислотными остатками для основного переходного состояния ингибитора барназы (Nölting, Andert, 2000). Размеры и окрашенность кружков указывают степень структурной консолидации, измеренной в единицах так называемого Φ -значения (Nölting, 1999b). Остальные пояснения см. в подписи к рис. 1.9, а.

ную скорость укладки можно объяснить как результат каталитического эффекта от образования тех кластеров, которые имеют особо высокое предпочтение при раннем образовании регулярных вторичных структур в присутствии значительного количества взаимодействий между третичными структурами (Nölting, Andert, 2000).

1.3. Структурные детерминанты констант скоростей укладки

Для дальнейшего понимания механизма и высокой скорости свертывания белка, а также для рационального конструирования искусственных белков и реконструкции медленно сворачивающихся белков с агрегирующими интермедиатами важно решить проблему (с субнанометровым разрешением), как образуются контакты (Nölting, 1998, 1999a, 1999b; Nölting et al., 1995, 1997a) и как консолидация структуры соотносится со скоростью укладки (Abkevich et al., 1995; Dill et al., 1993; Fersht, 1995 a,b; Fersht et al., 1992; Forge et al., 2000; Goto, Aimoto, 1991; Govindrajana, Goldstein, 1995; Griko, 2000; Gross, 1996; Gruebele, 1999; Hamada et al., 1995; Itzhaki et al., 1995; Karplus, Weaver, 1994; Kuwajima et al., 1996; Niggeman, Steipl, 2000; Nölting, 1999b; Nölting, Andert, 2000; Nölting et al., 1995, 1997a; Oregono et al., 1994; Unger, Moul, 1996; Wolynes et al., 1996).

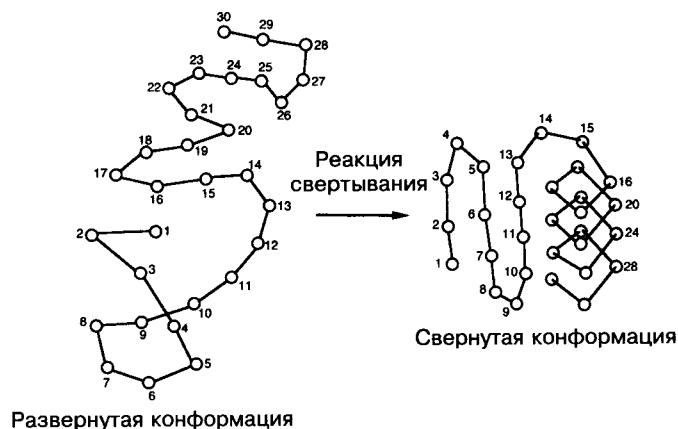


Рис. 1.10. Пример формирования внутримолекулярных контактов. Здесь среди остатков, контактирующих в свернутой конформации, остатки номер 10 и номер 30 являются наиболее удаленными друг от друга в первичной последовательности. Множество таких расстояний в первичной последовательности между остатками, контактирующими в пространстве, называется *топологией цепи*. Она является важным детерминантом для скорости сворачивания белка (Nölting et al., 2003).

Одним из ключевых является вопрос о взаимоотношении между локальными и нелокальными взаимодействиями в процессе укладки (Gromiha, Selvaraj, 1977, 1999; Goto et al., 1999; Tanaka, Sheraga, 1975, 1977). В ряде исследований было показано, что константы скорости укладки белков k_f зависят от контактного индекса (contact order — CO^{12}), который является мерой сложности топологии цепи белковой молекулы (рис. 1.10; Alm, Baker, 1999; Baker, 2000; Baker, DeGrado, 1999; Chan, 1998; Doyle et al., 1997; Grantcharova et al., 2000; Jackson, 1998; Koga, Takada, 2001; Mucos, Eaton, 1999; Plaxco et al., 1998; Riddle et al., 1999). Белками со сложной топологией являются такие, у которых нативная структура и структура переходного состояния содержат много контактов между остатками удаленными в первичной последовательности на большие расстояния друг от друга (рис. 1.11, а, б; 1.12, а, б). Они имеют константы скоростей свертывания на порядок более низкие, нежели белки с простой топологией, т. е. такие, у которых в нативной структуре и структуре промежуточного состояния преобладают контакты между остатками близко расположенными в первичной структу-

¹² Контактный индекс обычно определяется формулой: $CO = \frac{1}{L \cdot N} \sum \Delta S_{i,j}$ (см. Nölting et al., 2003). Существуют, однако, и другие слегка отличающиеся определения, см. (Ivankov et al., 2003) — добавлено автором.

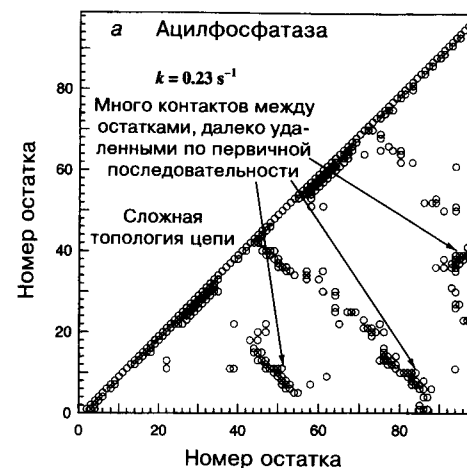


Рис. 1.11, а. Топология цепи (Nölting et al., 2003) ацилфосфатазы (Pastore et al., 1992). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Бруксейвской национальной лаборатории (Abola et al., 1997).

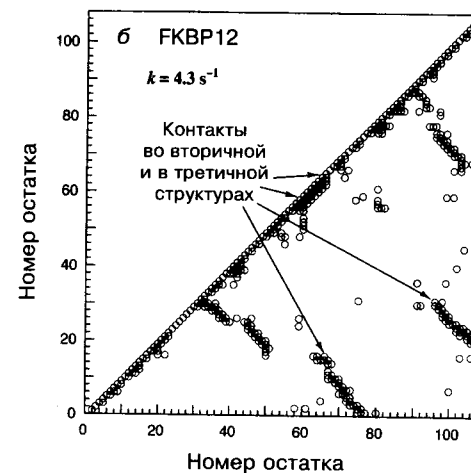


Рис. 1.11, б. Топология цепи (Nölting et al., 2003) белка FKBP-12, связывающего FK506¹³ (van Duyn et al., 1991). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Бруксейвской национальной лаборатории (Abola et al., 1997).

¹³ Белок FKBP-12 (1fkb.pdb) является иммунофилином; FK506 — синтетический иммуносупрессант. Разъяснение предоставлено автором по просьбе переводчика.

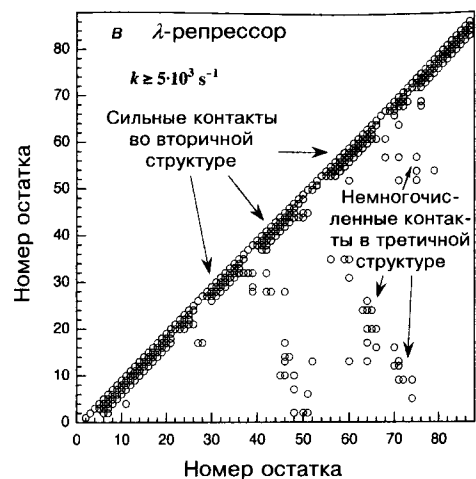


Рис. 1.11, а. Топология цепи (Nölting et al., 2003) димера λ -репрессора, связанного с ДНК (Beamer, Pabo, 1992). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Брукгейвенской национальной лаборатории (Abola et al., 1997).

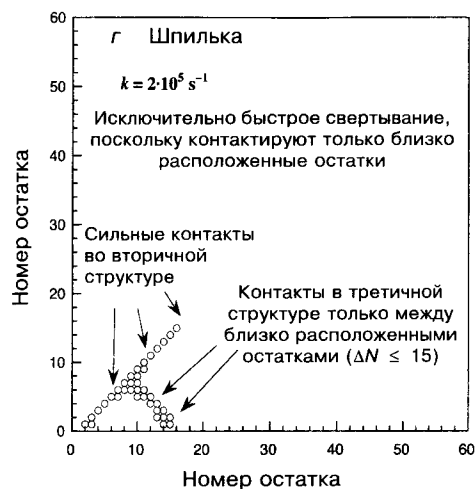


Рис. 1.11, б. Топология цепи (Nölting et al., 2003) шпилькообразующего пептида (41–56) из G-белка: GEWYDDATKTFTVTE (Achari et al., 1992; Muñoz, Eaton, 1999). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Брукгейвенской национальной лаборатории (Abola et al., 1997).

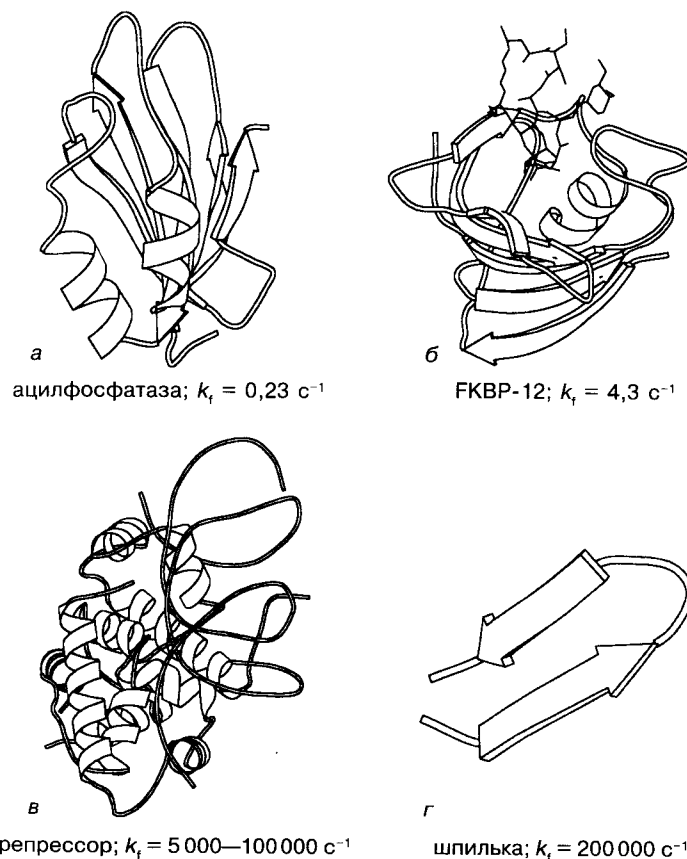


Рис. 1.12. Структуры трех белков и пептида с резко различными константами скоростей свертывания k_f :

а — ацилфосфатаза (Pastore et al., 1992); б — белок FKBP-12, связывающий FK506 (van Duyn et al., 1991); в — димер λ -репрессора, связанного с ДНК (Beamer, Pabo, 1992); г — шпилькообразующий пептид (41–56) из G-белка: GEWYDDATKTFTVTE (Achari et al., 1992; Muñoz, Eaton, 1999). Координаты атомов взяты из Банка белковых данных Брукгейвенской национальной лаборатории (Abola et al., 1997). Изображения созданы с помощью программы MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

ре (в последовательности) (рис. 1.11, а, г; 1.12, а, г). В пределах от 10^{-1} с $^{-1}$ до 10^8 с $^{-1}$ величина $-\log k_f$ хорошо коррелирует с величиной так называемого параметра топологии цепи (СТР); коэффициент корреляции достигает $\approx 0,87$:

$$-\log k \sim \text{СТР}, \quad \text{СТР} = \frac{1}{L \cdot N} \sum \Delta S_{i,j}^2, \quad (1.1)$$

где L — длина цепи, выраженная числом аминокислотных остатков в молекуле белка, N — число контактов между остатками в молекуле, $\Delta S_{i,j}$ — расстояние между контактирующими i -м и j -м остатками в последовательности, символ «тильда» ($\sim$) означает линейную корреляцию (рис. 1.13; Nölting et al., 2003).

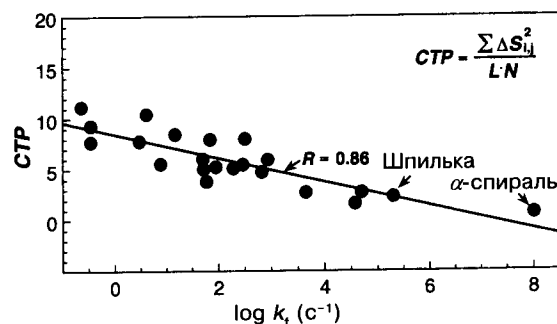


Рис. 1.13. Зависимость констант скоростей свертывания k_f , измеренная для 20 белков, 16-членной β -шпильки и 10-членного спирального фенилаланинового пептида, от топологии цепи, выраженной в единицах CTP (Nölting et al., 2003). Зависимость описывается уравнением регрессии $\log k_f = 7,56 - 0,895 \cdot CTP$ с коэффициентом корреляции $R = 0,86$. В пределах $10^{-1} \text{ c}^{-1} \leq k_f \leq 10^8 \text{ c}^{-1}$ точность предсказания констант скоростей свертывания для пептидов и белков вполне удовлетворительна (до двух порядков величины). Соотношение между структурой и скоростью свертывания важно потому, что оно говорит нам многое о механизме свертывания белка и помогает разрешить так называемый парадокс свертывания (парадокс Левинтала) (см. Nölting, 1999b; Nölting et al., 2003). Контакты между остатками были вычислены для пороговых расстояний до 4 Å, и контакты между атомами водорода не учитывались. Координаты для белков и для β -шпильки были взяты из Банка белковых данных Бруксгейвской национальной лаборатории (Abola et al., 1997). Подробности выбора координат см. в работе (Nölting et al., 2003). Координаты для 10-членного спирального фенилаланинового пептида были вычислены с помощью программы FoldIt (Jésior et al., 1994). 18 констант скорости для белков были взяты из работы (Jackson, 1998) и k_f для 16-членной β -шпильки — из работы (Muñoz, Eaton, 1999). k_f для 10-членного спирального фенилаланинового пептида были оценены по результатам работ (Williams et al., 1996; Grueble, 1999; Zhou, Kapplus, 1999; Nölting, 1999b). При внедрении в липидную мембрану подобные спирали в свернутых белках претерпевают интенсивные вибрации с частотой 10^7 c^{-1} и удлинение на 0,1 Å (см., например, Voigt, Schrötter, 1999). $k_f \approx 50\,000 \text{ c}^{-1}$ для термостабильного варианта I-репрессора и $k_f \approx 37\,000 \text{ c}^{-1}$ для гомеодомена — продукта гена *engrailed* дрозофилы взяты, соответственно, из работ (Burton et al., 1996, 1997; Mayor et al., 2000) и (Nölting et al., 2003).

Единственное существенное различие между определениями CTP и контактного индекса CO (который пропорционален $\Delta S_{i,j}$)¹⁴ состоит в квадратичной зависимости CTP от $\Delta S_{i,j}$; благодаря этому закономерность остается справедливой для гораздо более широкого диапазона значений констант скоростей и выполняется как для белков с преобладанием α -спиралей, так и для белков с преобладанием β -структур. Соотношение $-\log k_f \sim CTP$ позволяет также достаточно хорошо предсказывать времена укладки и для коротких пептидов. Для контактных расстояний от 3,5 Å до 8,5 Å коэффициент корреляции R для соотношения $-\log k_f \sim CTP$ составляет 0,80—0,87 (Nölting et al., 2003; рис. 1.14). При этом контактами между атомами водорода в остатках можно пренебречь, поскольку их положение в молекуле белка флуктуирует и обычно известно менее точно; их игнорирование практически не влияет на величину R (Nölting et al., 2003). Для небольших пептидов такое игнорирование снижает R незначительно: 0,75—0,81.

Следующим важным детерминантом скорости укладки является встречаемость одиночных сильных взаимодействий в молекуле белка. Например, некоторые быстро укладываемые белки термофильных организмов содержат относительно большое количество аспарагиновых остатков и солевых мостиков. Такие взаимодействия могут изменять скорость укладки на несколько порядков. Величина $-\log k_f$ коррелирует также с числом остатков в β -листах. Это может быть обусловлено большим числом контактов в β -листах, нежели в α -спиралях.

Соотношение $-\log k_f \sim CTP$ несовместимо с моделью укладки типа застежки-молнии, в которой время укладки должно быть примерно пропорционально длине застежки (расстоянию между ее началом и концом).

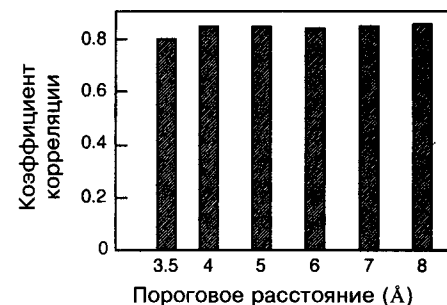


Рис. 1.14. Зависимость коэффициентов корреляции R для $-\log k_f \sim CTP$ от пороговых расстояний, использованных при вычислении контактов. Контакты между атомами водорода не учитывались; их учет лишь незначительно повышает значения R (Nölting et al., 2003).

¹⁴ Добавлено автором.

Очевидным образом это соотношение несовместимо также и с механизмом слепого (случайного) поиска, при котором $-\log k_f [\text{с}^{-1}] \approx L - 9$.

Проблема свертывания белков, т. е. объяснение удивительных скоростей, сложности и эффективности этого процесса (Nölting, 1999b; Nölting, Andert, 2000; Nölting et al., 1995, 1997a), приобрела и продолжает приобретать все более возрастающее значение в контексте не только понимания причин и механизмов болезней, связанных с укладкой (Alekhov, 2000; Bellotti et al., 1998; Brown et al., 1999; 2000; Gursky, 1999; Gursky, Alekhov, 2000; Kiennzl et al., 1999), но также в контексте множества других волнующих вопросов, таких как скопления макромолекул в клетках (Ellis, Hartl, 1999; van den Berg et al., 2000), высокий уровень экспрессии белков (Yardesty et al., 1999; Kohno et al., 1999; Kramer et al., 1999), термостабильность (Backmann et al., 1998; Williams et al., 1999) и проблемы упаковки (Clementi et al., 2000a,b; Efimov, 1998, 1999; Grigoriev et al., 1998, 1999).

Исследования укладки белков внесли свой вклад в лучшее понимание гидрофобных (Chan, 2000; Czaplewski et al., 2000; Drablos, 1999; Garcia-Hernandez, Hernandez-Arana, 1999), гидрофильных взаимодействий (Jésior, 2000), взаимодействия зарядов (Åqvist, 1999; de Cock et al., 1999), ассоциации боковых цепей (Galzitskaya et al., 2000) и образования дисульфидных связей (Chang et al., 2000a,b).

В настоящее время удается ускорить процесс укладки путем конструирования последовательностей с улучшенными свойствами (Irbäck et al., 1999) или с помощью вспомогательных молекул, называемых шаперонами, которые облегчают укладку (Csermely, 1999; El Khattabi et al., 1999; Gutsche et al., 2000 a,b; Itoh et al., 1999; Kawata et al., 1999; Yamasaki et al., 1999), и с применением углеводов в качестве матриц для конструирования белков *de novo* (Brask, Jensen, 2000).

Исследования свертывания белков способствовали также пониманию энергетического ландшафта укладки РНК (Chen, Dill, 2000), помогли в интерпретации многостадийности кинетики (Bai, 1999, 2000; Goldbeck et al., 1999), в объяснении результатов дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) при изучении кооперативного образования ядра сворачивания (Honda et al., 1999, 2000), эволюции формирования структуры (Chan, 1999; D'Alessio, 1999a,b), секреции белков (Berks et al., 2000; Chambert, Petit-Glatron, 1999) и предсказания их структуры (Crawford, 1999).

1.4. Имитационное моделирование укладки белка

Теоретически структуру нативного состояния белка можно определить, вычислив энергии всех конформаций молекулы. Такой подход мог бы быть успешным, даже когда нативная конформация не соответствует глобальному минимуму. Например, если в дополнение к таким расче-

там экспериментально установить некоторые минимальные ограничения на внутримолекулярные расстояния, то можно было бы решить, какая из конформаций является нативной. Увы, количество возможных конформаций полипептидной цепи астрономически велико. Например, как это следует из оценок энтропии, для белка, содержащего 100 остатков, это число имеет порядок 10^{100} (Nölting, 1999b). Существуют более оптимистичные оценки, которые основываются на механистических соображениях, но все равно число конформаций остается запредельным. Другая проблема заключается в том, что как положительные, так и отрицательные вклады в стабильности белка являются большими, и стабильность молекулы задается разностью двух больших, но почти равных чисел (Nölting, 1999b). Получается, что для того, чтобы вычислить глобальный минимум или путь укладки с достаточной точностью, эти два числа требуется определять с точностью до 3–4 значащих цифр (Nölting, 1999b). В настоящее время теория молекулярной энергетики не настолько точна, чтобы удовлетворить такому требованию. Вот почему до сих пор все еще невозможно вычислить глобальный минимум энергии для молекулы белка среднего размера без грубых приближений и основательных упрощений. Лишь недавно с помощью компьютерного (имитационного) моделирования молекулярной динамики за 700 мкс удалось найти энергетический минимум для 23-членного мини-белка (Snow et al., 2002).

Особо выделяются решетчатые модели для структуры белка и статистических энергий вследствие их исключительной простоты (см. Mirny, Shakhnovich, 2001; Shakhnovich, 1997; Shakhnovich et al., 1996). В этих моделях аминокислотные остатки представляются в виде жестких сфер и на возможные углы между связями накладываются жесткие ограничения, например, допускаются только углы 0° , 90° и -90° . Удивительно, но такие простые модели часто дают разумные результаты.

Рис. 1.15 в качестве примера показывает, как такое решетчатое моделирование позволяет свернуть небольшой белок в нативноподобную структуру. Здесь для имитаций использованы гидрофобные потенциалы, подобные тем, которые были описаны в работе (Casari, Sippl, 1992), но при этом введено сильное отталкивание на очень коротких расстояниях (рис. 1.16). Для моделирования притяжения использованы относительные коэффициенты для пар аминокислот из той же работы (Casari, Sippl, 1992, табл. 2). Начальными конформациями являются случайные комбинации основных структурных элементов: α -спираль, β -лист и случайный клубок. Если в качестве начальных использовать не совсем случайные конформации, а конформации, которые содержат флуктуирующие элементы вторичной структуры, то это ускорит имитацию на несколько порядков. Целью здесь было не вычислить уникальную нативную структуру, а найти набор конформаций с низкой энергией. Поэтому, дабы исключить неверные конформации и определить нативную конформацию, были использованы экспериментальные ограничения. Основные особенности этой реакции

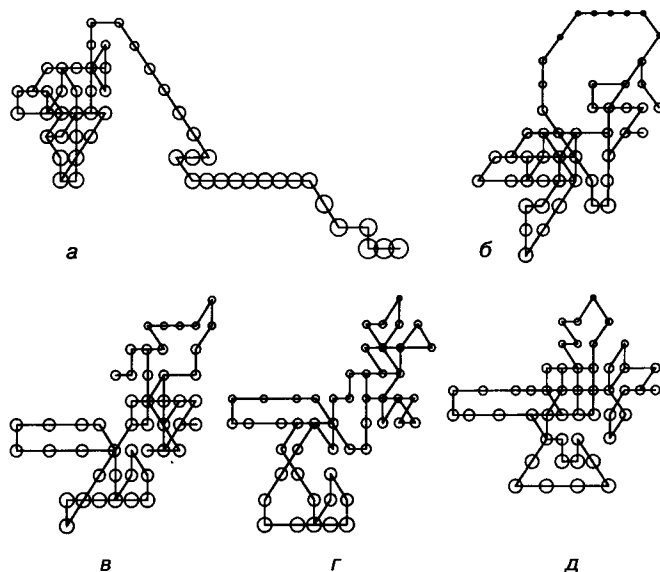


Рис. 1.15. Имитационное моделирование сворачивания белка:

a — сотый шаг имитации: инициация коллапса в ненативную конформацию; *b* — шаг 400: образование состояния, подобного расплавленной глобуле; *v* — шаг 4480 и *г* — шаг 17990: дальнейшая конденсация и реорганизация промежуточной расплавленной глобулы; *д* — шаг 38174: образование нативноподобного состояния. Каждый кружок представляет аминокислотный остаток.

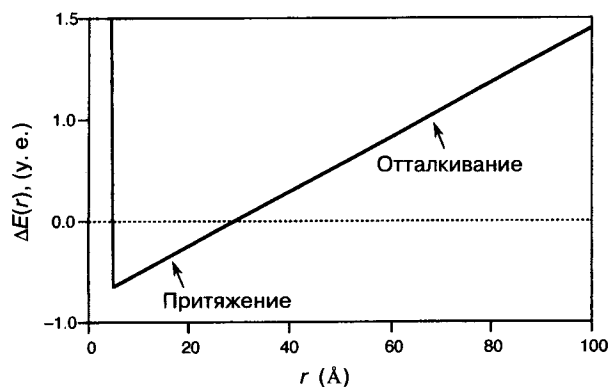


Рис. 1.16. Гидрофобный потенциал, использованный для имитационного моделирования сворачивания мини-белка, показанного на рис. 1.15; у.е. — условные (произвольные) единицы.

свертывания таковы: после 400 шагов имитации начальная вытянутая конформация коллапсирует в состояние, подобное расплавленной глобуле (рис. 1.15, *б*), которая после 38 174 шагов имитации преобразуется (реорганизуется) в конформацию, схожей с нативной (рис. 1.15, *д*)¹⁵.

Примечание переводчика

Разработка гено-инженерных методов сайт-специфического (направленного) мутагенеза открыла уникальную возможность получать сколь угодно представительные наборы искусственных белков с измененными первичными последовательностями. Сравнение термодинамических и кинетических параметров в процессах ренатурации и денатурации у природного белка «дикого типа» (*wt*) и у мутантных белков (*mt*) позволяет изучать механизм свертывания белковой цепи на уровне отдельных аминокислотных остатков. Структурные изменения белковой цепи на пути от нативной конформации до переходного состояния оценивают с помощью параметра Φ (или Φ_{TS}). Он определяется отношением:

$$\Phi = \frac{\Delta\Delta G_{TS-U}}{\Delta\Delta G_{F-U}},$$

где $\Delta\Delta G_{TS-U}$ — разность изменений энергии активации развертывания нативных форм белка дикого типа и мутантного белка относительно их свернутых форм; $\Delta\Delta G_{F-U} = (\Delta G_{U-F})_{wt} - (\Delta G_{U-F})_{mt}$ — разность изменений свободной энергии развертывания белковой цепи дикого типа и мутанта. Здесь U обозначает развернутую форму белка, F — свернутую, а TS — переходное состояние. Значение $\Phi = 1$ при свертывании указывает на сохранение свернутой формы в месте мутации. А значение $\Phi = 0$ при свертывании — на обретение мутированным остатком конформационной свободы полностью развернутой цепи (Попов, 1997; Попов и др., 1996).

Добавленная литература¹⁶

1. Ляхно В.Д., Устинин М.Н. (ред.). Компьютеры и суперкомпьютеры в биологии (+CD). — Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2002. — 528 с.
2. Мюльберг А.А. Фолдинг белка: Учеб. пособие. — СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. — 156 с.
3. Попов Е.М. Проблема белка. Том 3: Структурная организация белка. — М.: Наука, 1997. — 604 с.
4. Попов Е.М. Проблема белка. Том 4: Структура и функция белка. — М.: Наука, 1997. — 482 с.

¹⁵ См. также свежую статью автора (Nölting et al., 2004).

¹⁶ Добавления согласованы с автором.

5. Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова У.Д. Проблема белка. Том 2: Пространственное строение белка. — М.: Наука, 1996. — 480 с.
6. Попов Е.М., Решетов П.Д., Липкин В.М., Шуваева Т.М., Розынов Б.В., Патрушев Л.И. Проблема белка. Том 1: Химическое строение белка. — М.: Наука, 1995. — 496 с.
7. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. Курс лекций. — М.: Книжный Дом Университет, 2002а. — 376 с.
8. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями. 2 изд. — М.: Книжный Дом Университет, 2002б. — 376 с., 32 ил.
9. Финкельштейн А.В. Введение в физику белка. Курс лекций 1999—2000 гг. <http://phys.protres.ru/lectures/protein_physics/index.html>
10. Finkelstein A.V., Pitsyn O.B. Protein Physics. A Course of Lectures. Academic Press, An Imprint of Elsevier Science; Amsterdam — Boston — London — New York — Oxford — Paris — San Diego — San Francisco — Singapore — Sydney — Tokyo, 2002. — 354 p.
11. Ivankov D.N., Gabrunovsky S.O., Alm E., Plaxco K.W., Baker D., Finkelstein A.V. Contact order revisited: Influence of protein size on the folding rate, Protein Science 12, 2003. — 2057—2062.
12. Nölting B., Jülich D., Vonau W., Andert K. Evolutionary Computer Programming of Protein Folding and Structure Predictions. J Theor Biol 229, 2004. — 13—18¹⁷.

¹⁷ Статья добавлена автором.

ГЛАВА 2

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БИОМОЛЕКУЛ

Белки, пептиды, ДНК, РНК, липиды и органические кофакторы обладают разнообразными свойствами, такими как электрический заряд, молекулярная масса, гидрофобность и поверхностный рельеф. Очистка биомолекул обычно достигается с использованием методов, которые разделяют их на основе различий в этих физических свойствах. Такими методами являются ионный обмен (раздел 2.1), гель-фильтрация (раздел 2.2) и аффинная хроматография (раздел 2.3).

2.1. Ионообменная хроматография

В ионообменной хроматографии неподвижная твердая фаза обычно состоит из сорбента («смолы») с ковалентно связанными анионами или катионами. Противоположно заряженные ионы растворенного вещества в жидкой, подвижной фазе электростатическими силами притягиваются к ионам сорбента. Адсорбированные компоненты образца затем элюируют с применением солевого градиента, который постепенно десорбирует молекулы образца в порядке увеличения электростатического взаимодействия, с ионами в колонке (рис. 2.1—2.3). Вследствие своей превосходной разрешающей способности ионообменная хроматография является, пожалуй, наиболее важным типом хроматографических методов выделения и очистки белковых препаратов.

Выбор ионообменного сорбента (ионита) для очистки белка в значительной степени зависит от изоэлектрической точки белка — pI . При значениях pH , превышающих pI белка, его молекулы приобретают в целом отрицательный заряд и способны адсорбироваться анионным обменником. При pH ниже pI белок будет адсорбироваться катионным обменником. Например, если $pI = 4$, то в большинстве случаев целесообразно подобрать сорбент, который способен связывать белок при $pH > 4$. Поскольку при $pH > 4$ такой белок заряжен отрицательно, то сорбент должен быть анионообменником, например, с диэтиламиноэтильной функциональной группой (ДЭАЭ). Можно было бы ис-

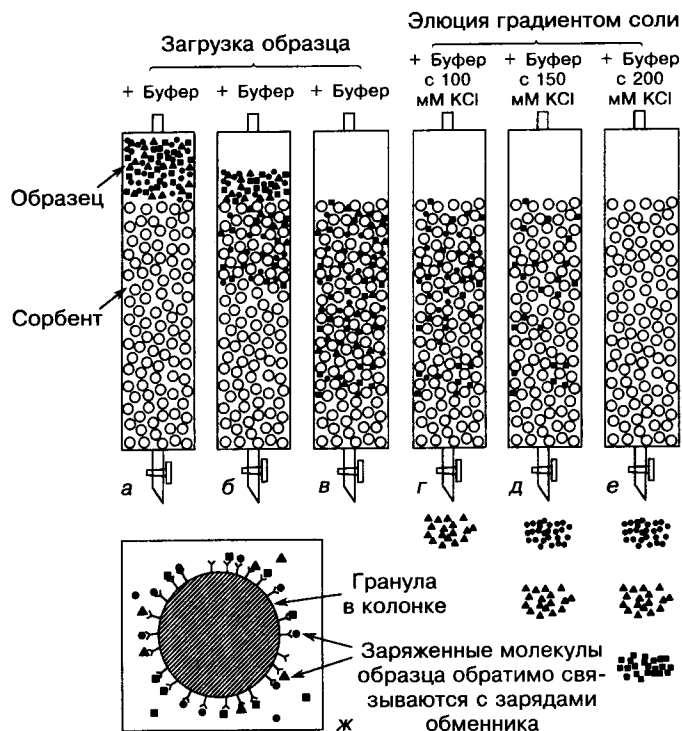


Рис. 2.1. Пример ионообменной хроматографии:

а–в — загрузка колонки: подвижные анионы (или катионы) удерживаются около катионов (или анионов), которые ковалентно присоединены к сорбенту (неподвижная фаза); г–е — элюция колонки солевым градиентом: ионы соли ослабляют электростатическое взаимодействие между ионами образца и ионами сорбента; молекулы образца с различными электростатическими свойствами элюируются при различных концентрациях соли, обычно в пределах 0–2 М; ж — взаимодействие молекул образца с ионами, присоединенными к сорбенту: при определенном pH и низкой концентрации соли большинство биомолекул трех типов, подлежащих разделению в данном примере, связываются обратимо с ионами неподвижной фазы.

пользовать $pH < 4$ и катионообменник, но многие белки в таких условиях нестабильны, либо образуют агрегаты. Если, напротив, белок, который мы хотим очистить, имеет $pI = 10$, то он будет заряжен положительно в условиях, пригодных, как правило, для ионообменной хроматографии, т. е. при pH около 7. Таким образом, в общем, для белка такого типа мы должны выбрать катионообменный сорбент, напри-

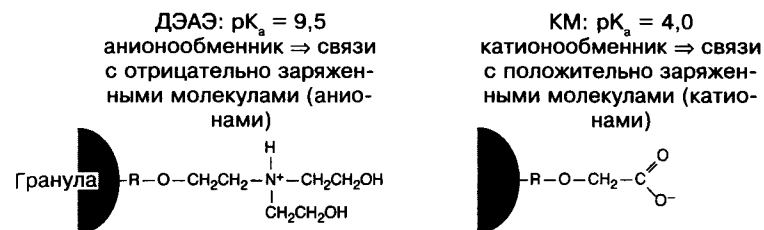


Рис. 2.2. Два ионообменника: диэтиламиноэтил (ДЭАЭ) и карбоксиметил (КМ). Положительные заряды ДЭАЭ-сорбента притягивают отрицательно заряженные биомолекулы. КМ-сорбенты пригодны для очистки положительно заряженных биомолекул.

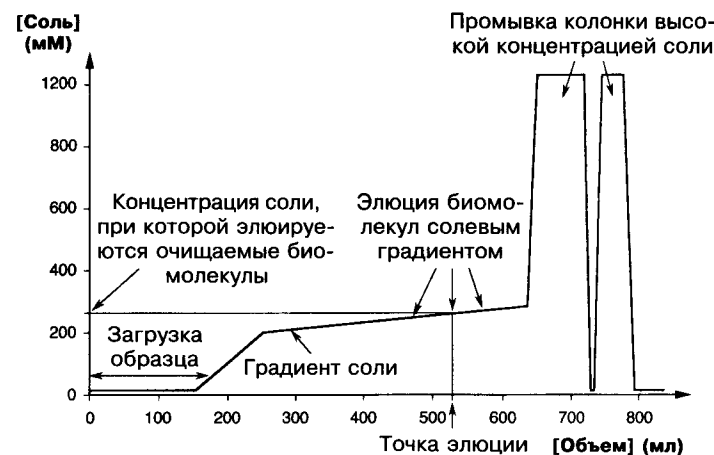


Рис. 2.3. Пример изменения концентрации соли в процессах адсорбции образца в ионообменной колонке, последующей элюции и очистки колонки. Пример протокола очистки: сначала с помощью шприца раствор биомолекул и примесей в буферном растворе загружается в колонку. Биомолекулы и некоторые примеси связываются с ионами, присоединенными к сорбенту. Загрузка завершается тем, что не связавшиеся молекулы частично вымываются из колонки дополнительной порцией того же буфера. На следующем этапе используется градиент соли, который создается с помощью программируемого насоса, смешивающего исходный буферный раствор с буферным раствором, содержащим соль. Вначале используется крутой градиент, он вымывает большую часть слабо связавшихся примесей. Очищаемые биомолекулы элюируются при определенной концентрации соли. Элюция отслеживается с помощью детектора по поглощению УФ-света при длине волны 280 нм с помощью абсорбционного детектора. Фракции с очищенным образцом собираются в пробирки коллектора. После каждого прогона колонка промывается (очищается) раствором 1–2 М KCl. Этим удаляется большинство сильно связывающихся с сорбентом примесей.

мер, с карбоксиметильной функциональной группой (КМ), которая при нейтральном рН заряжена отрицательно.

Адсорбирующая способность сорбента сильно зависит от рН и от рI разделяемых белков (рис. 2.4; табл. 2.1), но также от качества сорбента, прилагаемого давления и от числа прогонов колонки (рис. 2.5). Чтобы увеличить срок службы сорбента, его следует тщательно промыть, хранить в подходящем растворителе и не применять рН и давление вне предписанных допустимых пределов.

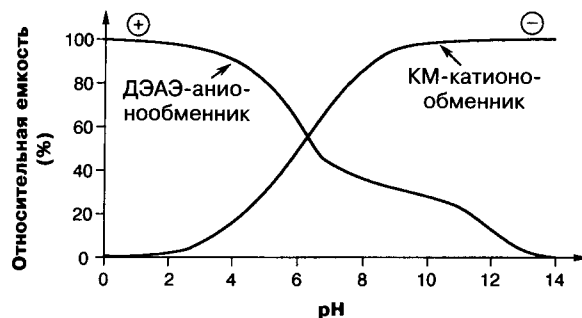


Рис. 2.4. Зарядовые свойства анионо- и катионообменников. Анионообменник с ДЭАЭ имеет значительную емкость при низких и средних значениях рН; катионообменник с КМ имеет высокую емкость при высоких и средних значениях рН.

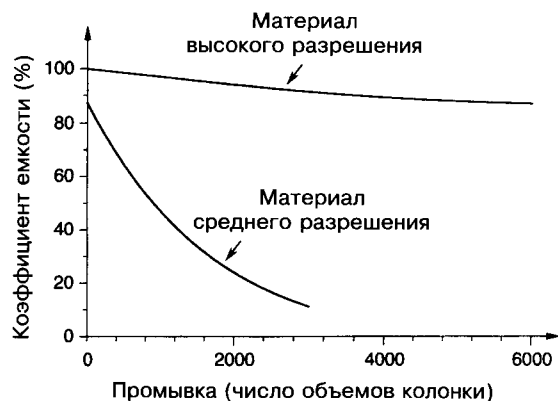


Рис. 2.5. Изменение емкости ионообменной колонки по мере ее использования. Колонки высокого разрешения, которые работают под давлением, могут выдерживать несколько тысяч прогонов.

Для разделения некоторых ферментов, которые могут потерять свою активность от соприкосновения с металлами, стеклянные колонки более предпочтительны, чем колонки из нержавеющей стали. Разрешающая способность хроматографического разделения зависит преимущественно от типа биомолекул, типа и качества сорбента, ионной силы градиента при элюции, от температуры и от геометрии колонки.

Таблица 2.1. Свойства некоторых важных ионообменников

Функциональная группа	Тип обменника	Интервал рН
$-\text{N}^+-\text{CH}_3$	Четвертичный амин (сильный анион)	1—11
$-\text{NH}_2$	Первичный амин (слабый анион)	1—8
$-\text{NH}$	Вторичный амин (слабый анион)	1—7
$-\text{N}$	Третичный амин (слабый анион)	1—6
$-\text{COO}^-$	Угольная кислота (слабый катион)	6—14
$-\text{SO}_3^-$	Сульфокислота (сильный катион)	1—14

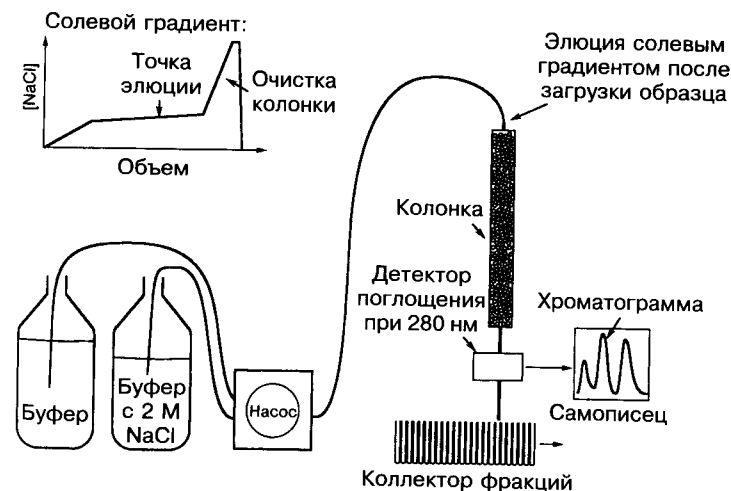


Рис. 2.6. Типичная установка ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для очистки белков. После загрузки образца (с помощью шприца) насос создает солевой градиент для элюции образца.

Экспериментальная установка (рис. 2.6) обычно состоит из бутылки с буферным раствором, бутылки с раствором соли в буферном растворе, программируемой помпы (перистальтического насоса), детектора поглощения при 280 нм (иногда при 210 нм), самописца и коллектора фракций. Если условия для очистки белка неизвестны, то их подбирают, предварительно анализируя небольшие порции образца. При препаративных выделениях необходимо иметь в виду, чтобы колонка не была перегружена, иначе это может сместить положение пиков и привести к значительным потерям продукта. Когда выделяют современные высоко экспрессируемые рекомбинантные белки, то часто удается получить белок 99%-й чистоты всего лишь за один этап ионообменной хроматографии. Однако, в случае сравнительно более низкого уровня экспрессии и существенного загрязнения образца примесями, одной только ионообменной хроматографии может оказаться недостаточно. Тогда последующая очистка препарата с помощью гель-фильтрации может значительно повысить чистоту белка.

2.2. Гель-фильтрация

Этот тип хроматографии является вариантом размерно-эксклюзионной хроматографии (т. е. основанной на исключении по размеру, или молекулярной эксклюзионной хроматографии) и известен также под названием гелепроникающей хроматографии¹. В ней отсутствует притяжение между неподвижной фазой (гелем) и растворенным веществом. При прохождении раствора образца сквозь пористый гель разделение молекул происходит по их размеру. Чем молекулы меньше, тем легче они проникают через поры внутрь гранул геля и поэтому дольше задерживаются там, путь их прохождения через колонку получается более длинным, чем у более крупных молекул. Крупные молекулы, которые не могут проникать в поры геля, не задерживаются в гранулах, а протекают между ними, и их путь и время прохождения через колонку гораздо короче (рис.2.7—2.10).

Гель-фильтрационная хроматография является также вспомогательным методом для оценки молекулярной массы молекул (рис. 2.11). Несмотря на то, что для этого существуют гораздо более точные методы, например, масс-спектрометрия (см. гл. 3), гель-фильтрация оказывается полезной для измерения равновесий мономер-мультимер при микромолярных (мкМ) концентрациях биомолекул.

¹ Синонимы: эксклюзионная или молекулярно-ситовая хроматография (см. Попов и др., 1995).

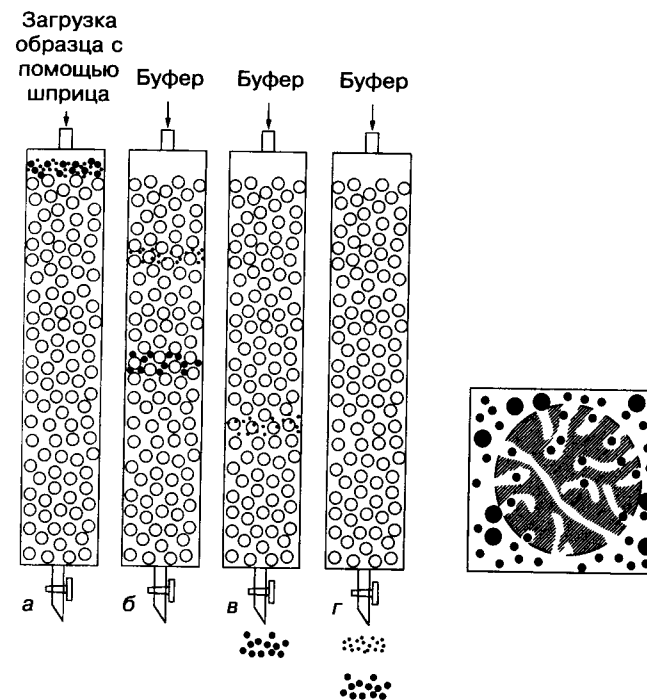


Рис. 2.7. Гель-фильтрационная хроматография. Малые молекулы в образце могут проникать внутрь гранул, вследствие этого они протекают через колонку медленнее. Крупные молекулы, которые не могут проникнуть в гранулы через поры, проходят сквозь колонку быстрее, чем более мелкие. Правильный размер пор и свойства растворителя являются решающими для хорошего разделения.

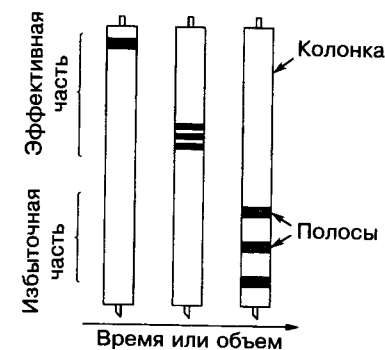


Рис. 2.8. Уширение полос в колонке из-за чрезмерной длины колонки. Так называемая эффективная часть колонки является достаточной для разделения. Слишком длинные колонки не улучшают очистку, но вызывают разбавление образца из-за уширения полос.

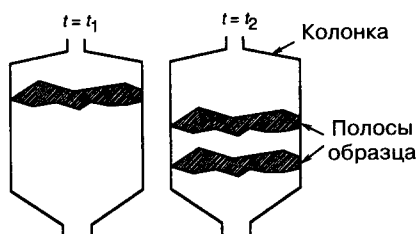


Рис. 2.9. Искажение полос в колонке слишком большого диаметра. Несмотря на то, что длина колонки вполне приемлема для разделения двух полос, в такой колонке происходит значительное разбавление продуктов и возможна также их контаминация вследствие неоднородной загрузки.

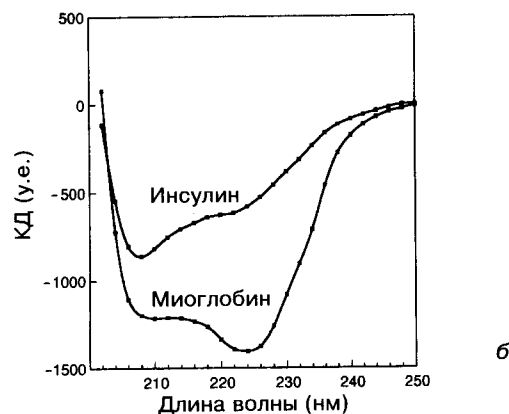
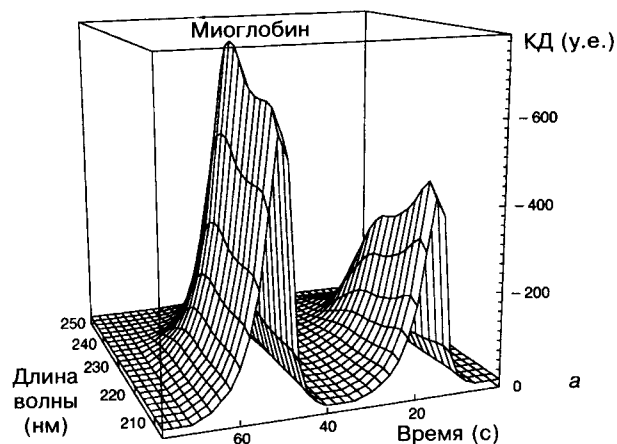


Рис. 2.10. *a* — хроматограмма разделения смеси миоглобина и инсулина с многоканальной регистрацией кругового дихроизма (КД). Преимущество многоканальной регистрации состоит в том, что она предотвращает искажение формы спектра (см. Nölting, 1999b); *б* — КД-спектры миоглобина и инсулина для сравнения.

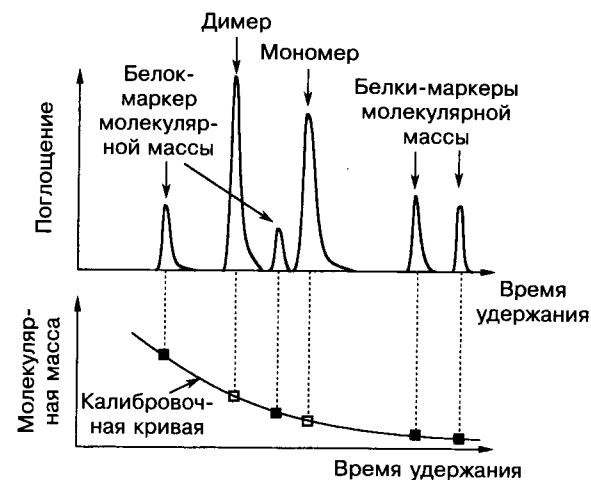


Рис. 2.11. Молекулы с известной молекулярной массой дают возможность оценить молекулярную массу неизвестной молекулы. В данном случае для исследуемой молекулы наблюдаются два пика, что указывает на равновесие мономер-димер.

2.3. Аффинная хроматография

Аффинная хроматография является методом, который позволяет очищать биомолекулы и другие полимеры на основе их индивидуальной структуры или функции². Она использует высоко специфичное сродство макромолекулы к другой молекуле, которая присоединена к неподвижной фазе. Принцип работы заключается в следующем: *a* — образец вводят (впрыскивают) в колонку; *б* — через колонку пропускают буферный раствор, в результате чего молекулы, у которых нет сродства к неподвижной фазе, вымываются из колонки, а молекулы с высоким сродством к неподвижной фазе удерживаются в колонке; *в* — удерживаемые молекулы элюируются из колонки буферным раствором с высокой концентрацией соли, или с другим значением pH, или растворителем другого состава (рис. 2.12). Смолу можно приготовить, используя ряд белковых зацепок. Такие метки не должны вызывать неестественных взаимодействий и не должны изменять конформацию присоединяемого к ним белка. Широко распространенными являются полигистидиновые метки, присоединяющиеся к белку методами генетической инженерии (рис. 2.13). Типичная зацепка

² Более точные названия: биоаффинная хроматография или хроматография по биоспецифическому сродству (см. Попов и др., 1995, с. 253).

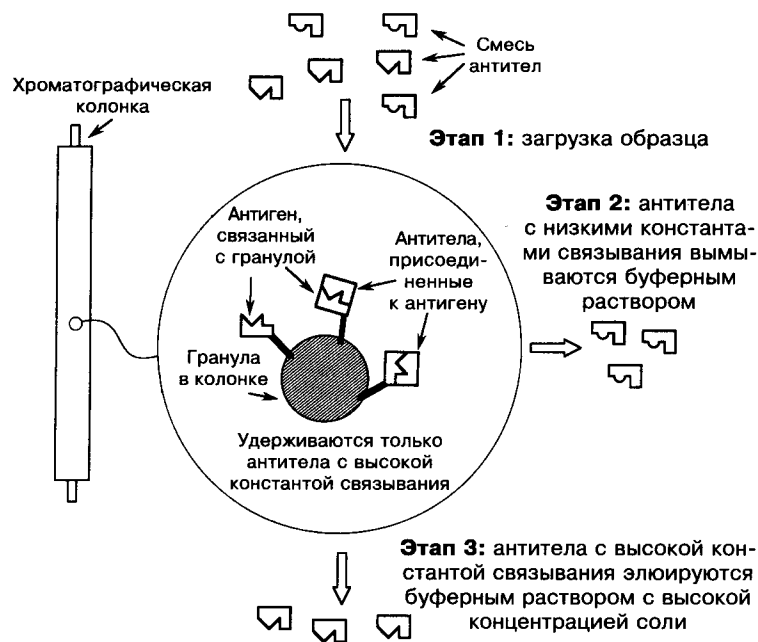


Рис. 2.12. Очистка антител с помощью аффинной хроматографии. Антиген химически связан с гранулами носителя, и смесь антител пропускается через колонку. Антитела с высокой константой связывания присоединяются к антигену и позже элюируются буферным раствором с высокой концентрацией соли.



Рис. 2.13. Прикрепление белка с гистидиновой зацепкой к грануле в аффинной колонке. Около 10 гистидиновых остатков присоединены к белку с помощью генетической инженерии, например, сочетанием сайт-специфического мутагенеза с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) (см. Nölting, 1999b). Гистидиновые остатки прочно связываются с гранулами, сделанными из никель-хелатирующей смолы.

содержит 8—12 гистидиновых остатков. Она способна связываться с соединениями никеля, находящимися на поверхности хроматографических гранул. Рис. 2.14 демонстрирует несколько иной вариант аффинной хроматографии, в котором неправильно свернутый белок с помощью шаперонов сворачивается правильным образом и элюируется буферным раствором.

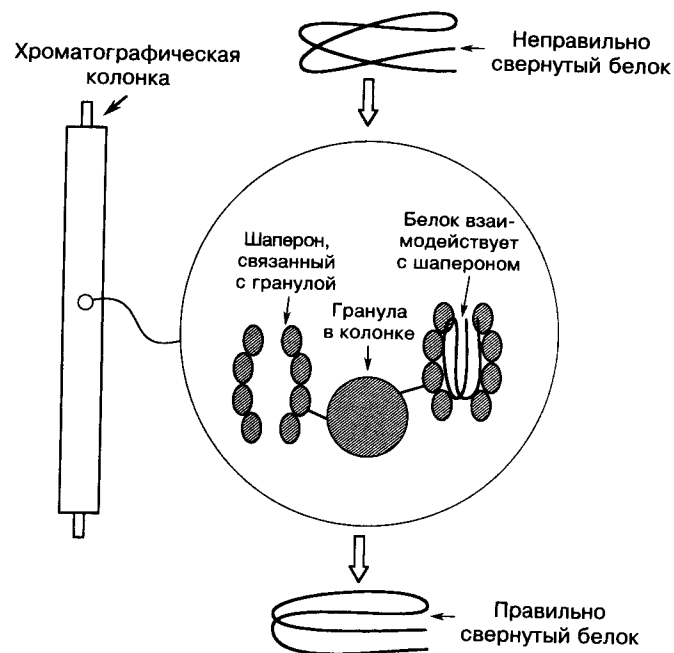


Рис. 2.14. Исправление свертывания дорогих, плохо сворачивающихся, белков: шапероны, называемые также шаперонинами, прикреплены к гранулам, и развернутый или неправильно свернутый белок пропускается сквозь колонку. Шаперон взаимодействует с образцом белка и катализирует его сворачивание в правильной конформации.

2.4. Противоточная хроматография и ультрафильтрация

Сравнительно давним методом является хроматография с использованием аппарата противоточного распределения Крэга (рис. 2.15). В настоящее время он используется для крупномасштабной очистки некоторых веществ в тех случаях, когда другие методы оказываются излишне дорогими. В противоточной хроматографии обе фазы — и подвижная и неподвижная — являются жидкостями, и разделение основано на распределении образца между этими двумя жидкостями. Она может функционировать, например, следующим образом (рис. 2.15): *a* — определенное биохимическое вещество имеет более высокую растворимость в фазе А, чем примеси, но в фазе В его растворимость ниже, чем примесей; *b* — фаза В с высокой концентрацией примесей пере-

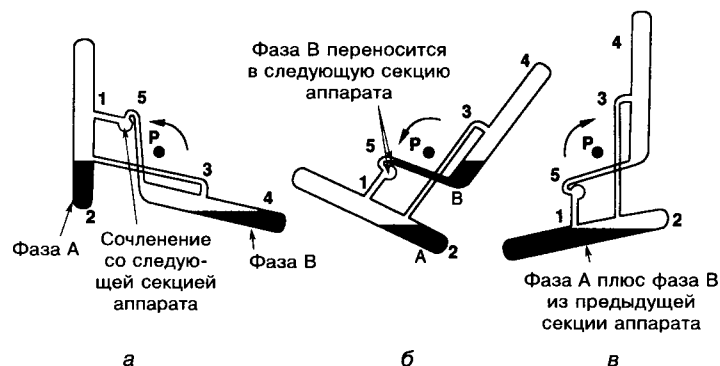


Рис. 2.15. Аппарат противоточного распределения Крейга: обе фазы — неподвижная и подвижная являются жидкостями. Разделение образца основано на распределении его компонентов между этими двумя жидкими фазами (см. текст).

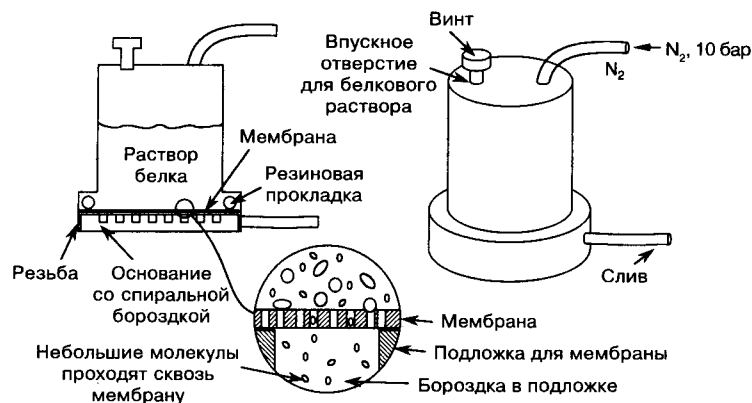


Рис. 2.16. Аппарат для ультрафильтрации (поставляется, например, фирмой Amicon Inc., Beverly, MA). Под давлением азота из баллона раствор белка фильтруется через мембрану. Небольшие молекулы проходят через мембрану и собираются на выходе. Крупные молекулы остаются в камере.

носятся в следующий аппарат, и свежая порция фазы В переносится из предыдущего аппарата в указанный аппарат; *в* — фазы А и В смешиваются и снова разделяются, и процесс повторяется. В ходе таких последовательных циклов различные вещества перемещаются сквозь батарею противоточных аппаратов с различной скоростью и отбираются в конце батареи.

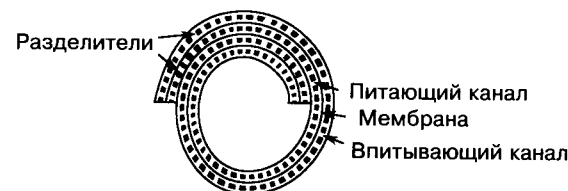


Рис. 2.17. Спиральный концентратор (вид сбоку) (например, Millipore Corp., Bedford, MA). Давление создается центрифугированием концентратора. Как и в аппарате для ультрафильтрации (рис. 2.16) небольшие молекулы проходят сквозь мембрану, а крупные — задерживаются.

Строго говоря, ультрафильтрация (рис. 2.16 и 2.17) не является хроматографическим методом. Однако ее следует здесь упомянуть, так как она является исключительно эффективным способом подготовки образцов для последующей хроматографии, а иногда может даже заменить хроматографию. Она применима для очистки белков (*а*), смены буферных растворов (*б*) и концентрирования белковых растворов (*в*). Очистка белка с определенной молекулярной массой (M_w) осуществляется в два этапа: сначала в аппарате ультрафильтрации используют мембрану с порогом пропускания выше, чем M_w , и собирают фильтрат (*а*). Затем используют мембрану с порогом пропускания ниже, чем M_w , и собирают раствор, оставшийся в камере (*б*).

Добавленная литература

1. Зайдель-Моргенштерн А. Препаративная градиентная хроматография. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2003, Т. XLVII, № 1, С. 80—89.
2. Карцова А.А. Жидкостная хроматография в медицине. Соросовский образовательный журнал. Т. 6, №11, 2000.
3. Отто М. Методы аналитической химии (в 2-х томах). — М.: Техносфера, 2004.
4. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1985, 536 с. <http://www.chemport.ru/?id=946>.
5. Российский Химический Журнал. Том XLVII, 2003. № 1: 100 лет хроматографии.
6. Руденко Б.А., Руденко Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы. — М.: Наука, 2002.
7. Стыскин Е.Л., Ицисон Л.Б., Брауде Е.Б. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. — М.: 1986. Три главы книги доступны на сайте: <http://www.hpcl.ru/liter.htm>.
8. Яшин Я.И., Яшин А.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2003, Т. XLVII, № 1, с. 64—79.
9. Rudenko B.A. High Performance Chromatographic Processes. Winnipeg, Wuerz Publ, 2001.

Хроматография в Интернете:

1. ЗАО БиХимМак СТ, ВЭЖХ хроматографы: <http://www.bcmst.ru/hrom/index.htm>.
2. Компания «ЦветХром», НПО «ЦВЕТ»: <http://www.tsvet.com/index.html>.
3. Новые аналитические системы — компания UniChrom: <http://www.unichrom.com/matrix-lcr.shtml>.
4. HPLC хроматография в России: <http://www.hplc.ru/links.htm>.
5. Аналитика — мир профессионалов: <http://www.anchem.ru>.
6. Научно-производственная фирма аналитического приборостроения ЛЮМЭКС: <http://www.anchem.ru>.
7. Справочник <http://www.chemport.ru/chromatography.shtml>.
8. MedBioLink — база данных по компаниям и продуктам российского биотехнологического рынка. <http://www.medbiolink.ru>.
9. Представитель хроматографического и масс-спектрометрического оборудования Thermo Electron™: <http://www.textronica.com>.
10. НПФ Микроаналитические системы®: <http://www.mas-spb.narod.ru/indexvzh.htm>.

ГЛАВА 3**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ**

Масс-спектрометрия является исключительно важной аналитической техникой для идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду m/z в ионизированном состоянии. Она особенно полезна для обнаружения и анализа макромолекул в следовых количествах менее 1 пг (10^{-12} г). Принципиальная схема устройства масс-спектрометра включает в себя инжектор (дозатор) проб, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов (рис. 3.1). Сначала проба впрыскивается в ионизатор, где молекулы образца ионизируются. Затем ионы образца анализируются и регистрируются. Чтобы предотвратить столкновение с молекулами газа, ионизатор, анализатор масс и детектор ионов обычно работают в вакууме.

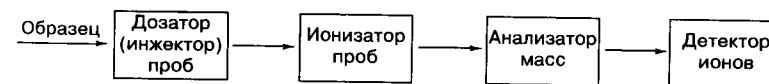


Рис. 3.1. Принципиальная схема масс-спектрометра.

Способность масс-спектрометра разделять ионы описывается величиной R , которая называется *разрешающей способностью* (или *разрешением*), она определяется как:

$$R = \frac{m}{\Delta m}, \quad (3.1)$$

где m — масса иона, а Δm — разность масс между двумя различными пиками. Область значений R обычно находится в интервале между 100 и 500 000.

3.1. Принципы работы и типы спектрометров

В соответствии с конструкцией анализатора масс существуют пять основных типов масс-спектрометров (МС):

- 1) секторные магнитные и (или) электрические МС (рис. 3.2 и 3.3);
- 2) квадрупольные МС (рис. 3.4);
- 3) МС с ионной ловушкой (рис. 3.5);
- 4) время-пролетные МС (рис. 3.6—3.9);
- 5) МС с преобразованием Фурье (рис. 3.10).

Времяпролетные масс-спектрометры (ВП-МС) обычно менее дорогие, чем другие типы масс-спектрометров. По сравнению с квадрупольными МС и многими секторными МС они обладают тем преимуществом, что регистрируют массы всех ионов без сканирования, что способствует их высокой чувствительности. Однако у ВП-МС меньшая разрешающая способность и меньший интервал регистрируемых масс, чем у масс-спектрометров с преобразованием Фурье (МС-ПФ).

3.1.1. Секторный масс-спектрометр

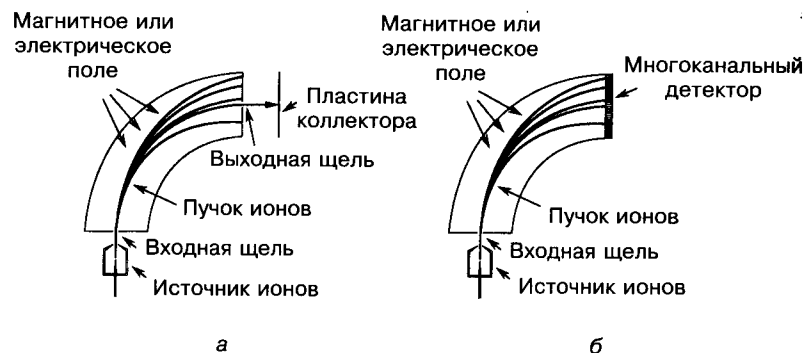


Рис. 3.2. Одиночный магнитный или электрический сектор масс-спектрометра с одноканальным (а) и многоканальным (б) детектором. Ионы, покидающие источник ионов, ускоряются и проходят через сектор, в котором магнитное или электрическое поле прикладывается перпендикулярно к направлению их движения. Поле изгибает траекторию полета ионов и принуждает ионы с различным отношением m/z разлетаться веером. В сканирующем анализаторе масс (а) изменяют силу электрического или магнитного поля, при этом каждый раз регистрируется только одна масса. В несканирующем анализаторе (б) все массы регистрируются одновременно (в определенном диапазоне масс) с помощью многоканального детектора.

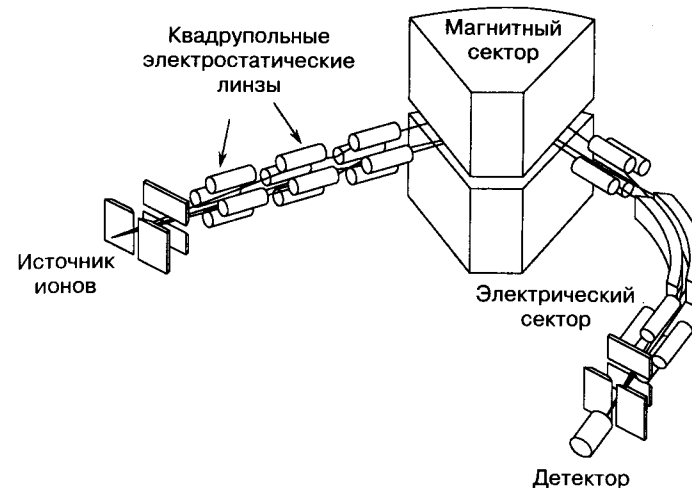


Рис. 3.3. Настольный односекторный масс-спектрометр (GCmateII от JEOL Ltd., Токио; Matsuda, 1976, 1981; Matsuda et al., 1974). Схема ионной оптики с высоко эффективной трансмиссией.

3.1.2. Квадрупольный масс-спектрометр

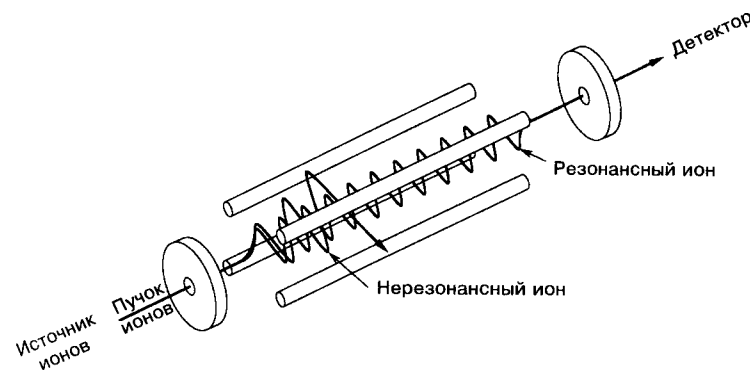


Рис. 3.4. Квадрупольный масс-спектрометр. Пучок ионов с помощью электрического поля разгоняется до высокой скорости и проходит сквозь квадрупольный анализатор масс, состоящий из четырех металлических стержней. К этим стержням прилагается напряжение постоянного или переменного тока таким образом, что в каждый момент времени сквозь анализатор пролетают ионы только с одним соотношением массы к заряду — m/z . Чтобы просканировать различные m/z , напряжение тока варьруют.

3.1.3. Масс-спектрометр с ионной ловушкой

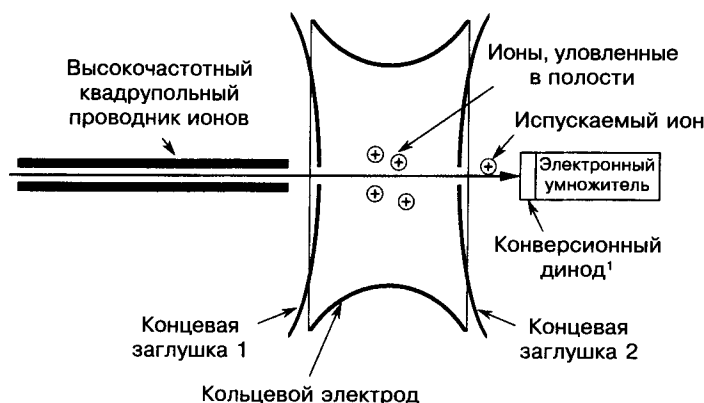


Рис. 3.5. Анализатор масс с ловушкой ионів. С помощью различных высокочастотных сигналов, которые прилагаются к кольцевому электроду и концевым заглушкам, все ионы улавливаются в полости и затем последовательно испускаются соответственно величине их отношений m/z .

3.1.4. Времяпролетный масс-спектрометр

Времяпролетные ² масс-спектрометры отличаются тем, что в них с помощью, например, импульса ионизирующего лазера (рис. 3.6) или с помощью импульса высокого напряжения в электрическом затворе ионы стартуют в одно и то же время. После прохождения через ускоряющую разность потенциалов V ион с зарядом z , массой m и скоростью v приобретает кинетическую энергию E :

$$E = zV = \frac{mv^2}{2}. \quad (3.2)$$

¹ Диод [от греч. *dyn*(amis) — сила и (электр)од], электрод в фотоэлектронном умножителе, обладающий высоким коэффициентом вторичной электронной эмиссии.

² Распространено написание как с дефисом: время-пролетные, так и слитное: времяпролетные.

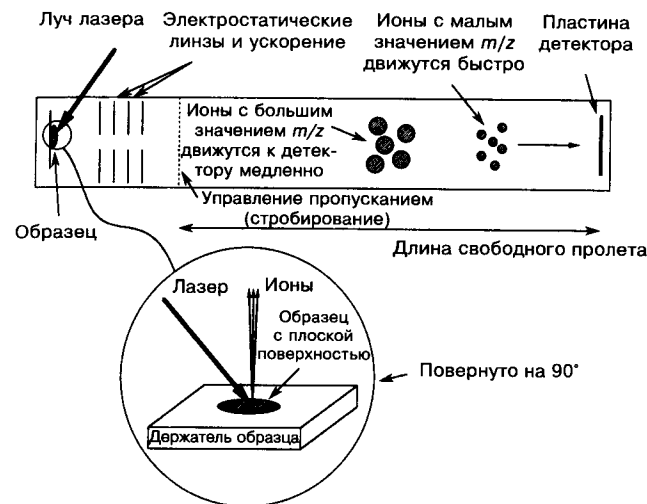


Рис. 3.6. Линейный времяпролетный масс-спектрометр (ВП-МС) с лазерной десорбционной ионизацией на матрице (ЛДИМ). Линейная конфигурация ВП-МС представляет простейший вариант времяпролетной техники. Типичный диапазон масс лежит между 0 и 100 кДа, и типичное разрешение масс $R = m/\Delta m$ составляет 300—200.

Для длины пути l_{TOF} время пролета t составляет:

$$t = l_{\text{TOF}} \sqrt{\frac{m}{2zV}}. \quad (3.3)$$

Например, для $l_{\text{TOF}} = 0,1$ м, $z = e = 1,602 \times 10^{-19}$ Кл, $m = 10$ кДа = $10 \text{ кг}/6,0221 \times 10^{23}$ и $V = 100$ В мы получаем $t = 72$ мкс. В этом примере, чтобы различать массы в 1 Да требуется разрешение времени в 3,6 нс. К сожалению, не все ионы стартуют в одно и то же время и не все ионы имеют одну и ту же скорость. Разница в скоростях называется *хроматической абберацией*. В простой линейной конструкции ВП-МС из-за хроматической абберации и различий в стартовом времени очень трудно обеспечить требования, необходимые для высокого разрешения (рис. 3.6). В отражательном (рефлекторном) ВП-МС (рис. 3.7—3.9) ионная оптика обращает направление движения ионов и тем самым снижает хроматическую абберацию.

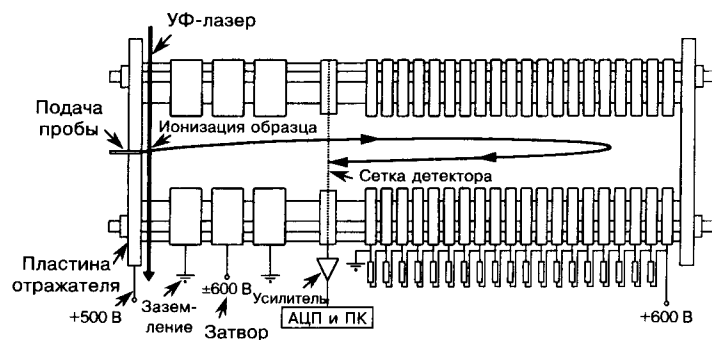


Рис. 3.7. Простой отражательный (рефлекторный) времяпролетный масс-спектрометр (см. Bruyden, 1995). Отражатель улучшает разрешающую способность масс-спектрометрии: он увеличивает время пролета и может фокусировать ионы. Здесь импульсы напряжения на электроде затвора обеспечивают одинаковое стартовое время для ионов.

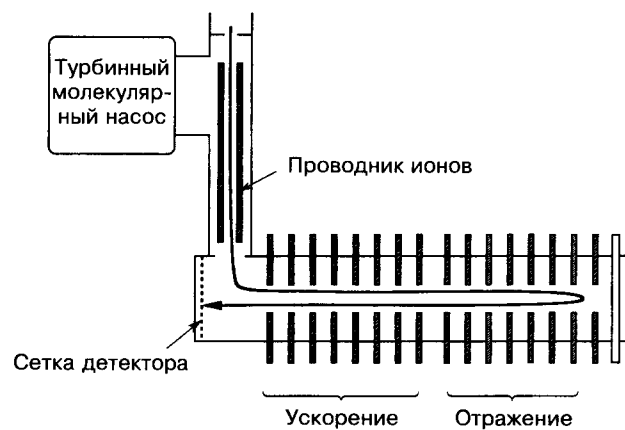


Рис. 3.8. Отражательный времяпролетный масс-спектрометр с ортогональным впускным каналом (см. BioTOF II от Bruker Daltonik, Бремен, Германия).

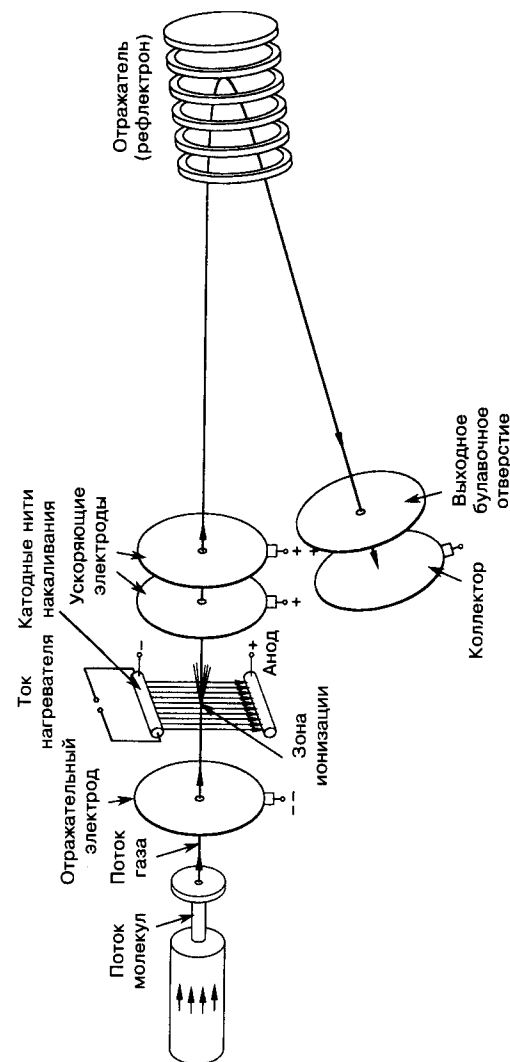


Рис. 3.9. Времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения. Подробности см. IonSpec Corp., Irvine, CA; JEOL USA, Inc., Peabody, MA; Micromass and Water Corp., Milford, MA; Thermo Finnigan, San Jose, CA; Varian Instruments, Walnut Creek, CA.

3.1.5. Масс-спектрометр с преобразованием Фурье

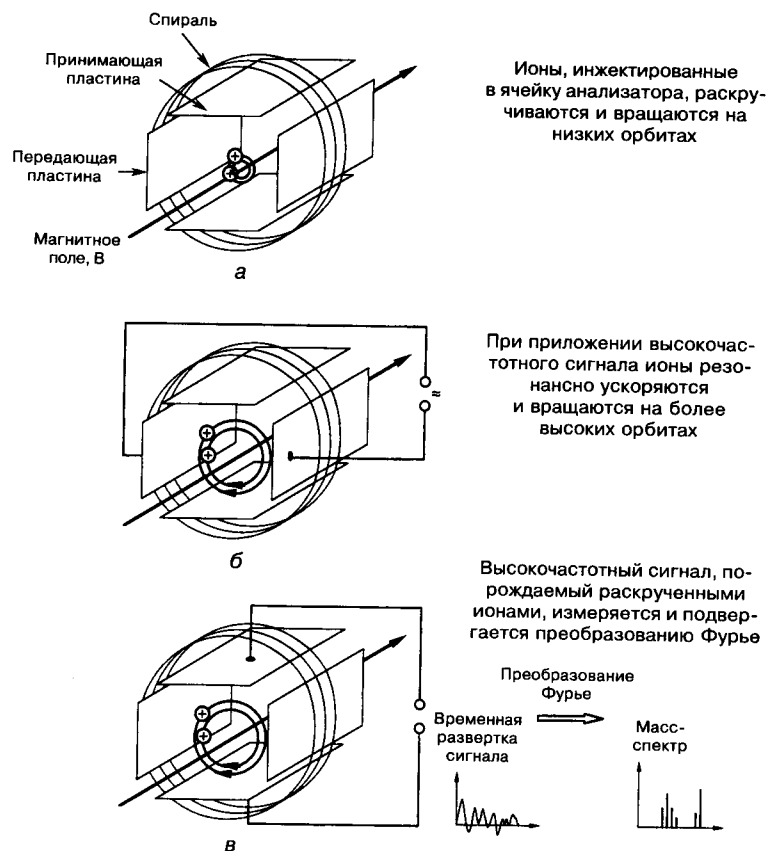


Рис. 3.10. Принцип работы масс-спектрометра с преобразованием Фурье (МС-ПФ). Другое его название: «ион-циклотрон-резонансный масс-спектрометр» (см. IonSpec Corp., Lake Forest, CA; Bruker Daltonik, Бремен, Германия):

а — ионы впрыскиваются (инжектируются) в ячейку анализатора. Магнитное поле вынуждает тепловые ионы вращаться по низким орбитам, радиус которых зависит от отношения массы ионов к их заряду m/z ; б — прилагаемые высокочастотные импульсы резонансно передвигают ионы на более высокие орбиты; в — высокочастотный сигнал, порождаемый принудительным вращением ионов, измеряется и подвергается Фурье-преобразованию. О методах такого преобразования см. раздел 4.1.1. Замечательной особенностью МС-ПФ является высокое разрешение (R), которое обычно превышает 100 000.

3.1.6. Ионизация, транспорт и детекция ионов

Обычными методами ионизации являются электрораспыление (рис. 3.11), матричная лазерно-десорбционная ионизация (МалДИ³) (рис. 3.6), бомбардировка электронами, бомбардировка ионами и химическая ионизация. Ионы управляются электростатическими линзами (октопольными) проводниками (квадрупольными) или восьмипольными (ионные сигналы, исходящие из анализатора масс, обычно регистрируются с помощью вторично-электронного умножителя (ВЭУ) (рис. 3.13). В МС-ПФ ионы, разогнанные (раскрученные) в циклотроне, непосредственно регистрируются путем измерения и Фурье-преобразования сигналов напряжения, которое они индуцируют в принимающих (накопительных) электродах.

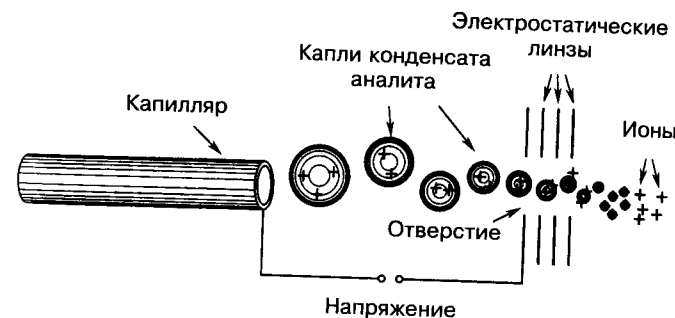


Рис. 3.11. Электрораспылительный метод ионизации. Анализируемый раствор доставляется из жидкостного хроматографа или с помощью шприцевого насоса и распыляется через узкий нагретый капилляр в масс-спектрометр. Между капилляром и отверстием в электростатических линзах создается разность потенциалов 200 В — 5 кВ. Ионы образуются вследствие испарения заряженных капель анализируемого раствора в вакууме.

³ В отечественной литературе нет устоявшегося перевода для MALDI — matrix-assisted laser desorption ionization. Кроме используемого здесь перевода часто фигурирует выражение: лазерная десорбция в матрице, или лазерная десорбция при содействии матрицы.

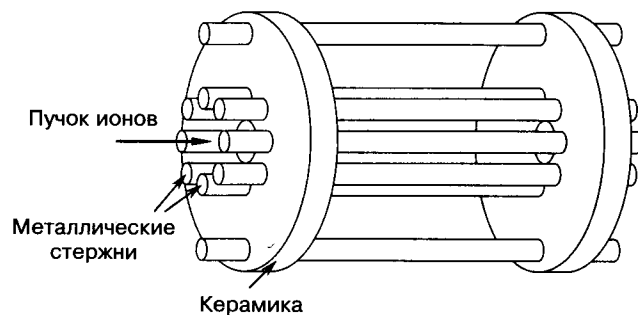


Рис. 3.12. Высоочастотный восьмипольсый проводник для инъекции ионов в ионную ловушку масс-спектрометра. По сравнению с четырехпольсый (квадропольный) проводником ионов он обеспечивает более высокую точность наведения.

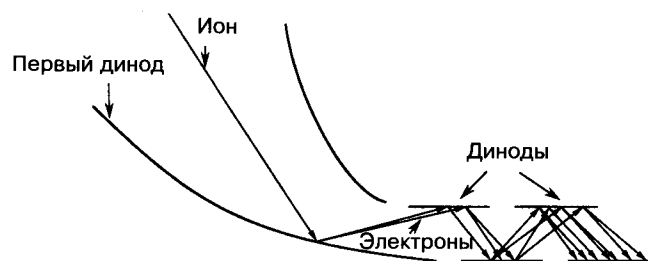


Рис. 3.13. Вторично-электронный умножитель для масс-спектрометра. Первый динод преобразует поток ионов в поток электронов. Последующие диноды умножают число электронов в 10^3 – 10^8 раз. Коэффициент усиления зависит от напряжения между динодами, от их числа и от их композиции. Последний динод при соединении к амперметру (не показан).

3.1.7. Фрагментация ионов

Существенное улучшение информационного содержания спектров достигается фрагментацией образца, которое можно осуществить, например, в ионизационной камере (рис. 3.14) или в полости ионной ловушки анализатора масс, заполненной гелием (рис. 3.5, см. также раздел 3.2).

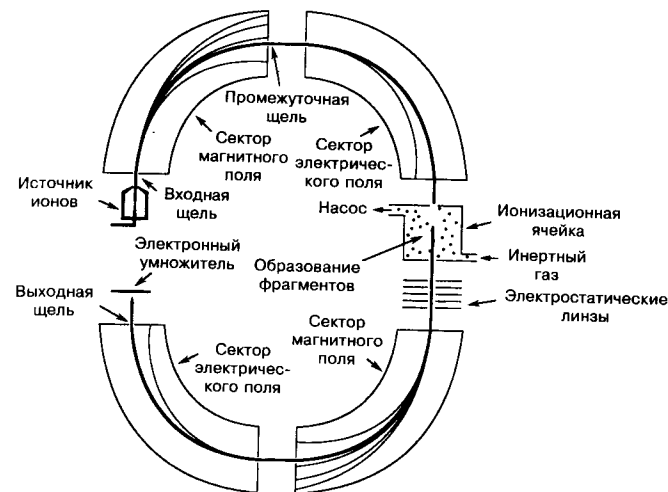


Рис. 3.14. Секторный масс-спектрометр высокого разрешения с ионизационной камерой.

3.1.8. Сочетание с хроматографическими методами

Для исследования высоко сложных биосистем, таких как целые клетки, масс-спектрометрия часто комбинируется с хроматографическими методами, например как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (рис. 3.15 и 3.16) или газовая хроматография (ГХ) (рис. 3.17). Два типа коннекторов (соединительных устройств) между хроматографом и масс-спектрометром показаны на рис. 3.15 и 3.18; оба они пригодны и ВЭЖХ. В результате получаются двухмерные спектры. При этом значительно усиливается разрешающая способность анализа сложных смесей с большим числом компонентов. Если, например, ионообменная хроматография сырых клеточных экстрактов имеет разрешение $R = 100$, а разрешение масс-спектрометра составляет $R = 10\,000$, то их комбинация может дать разрешение $R = 1\,000\,000$ для небольших и среднего размера клеточных белков, для которых результаты обоих методов обычно не зависят друг от друга.

Влияние буферных растворов, которое иногда наблюдается при масс-спектрометрии, обычно удается снизить, если увеличить концентрацию образца, уменьшить концентрацию буфера или сменить буфер (рис. 3.19).

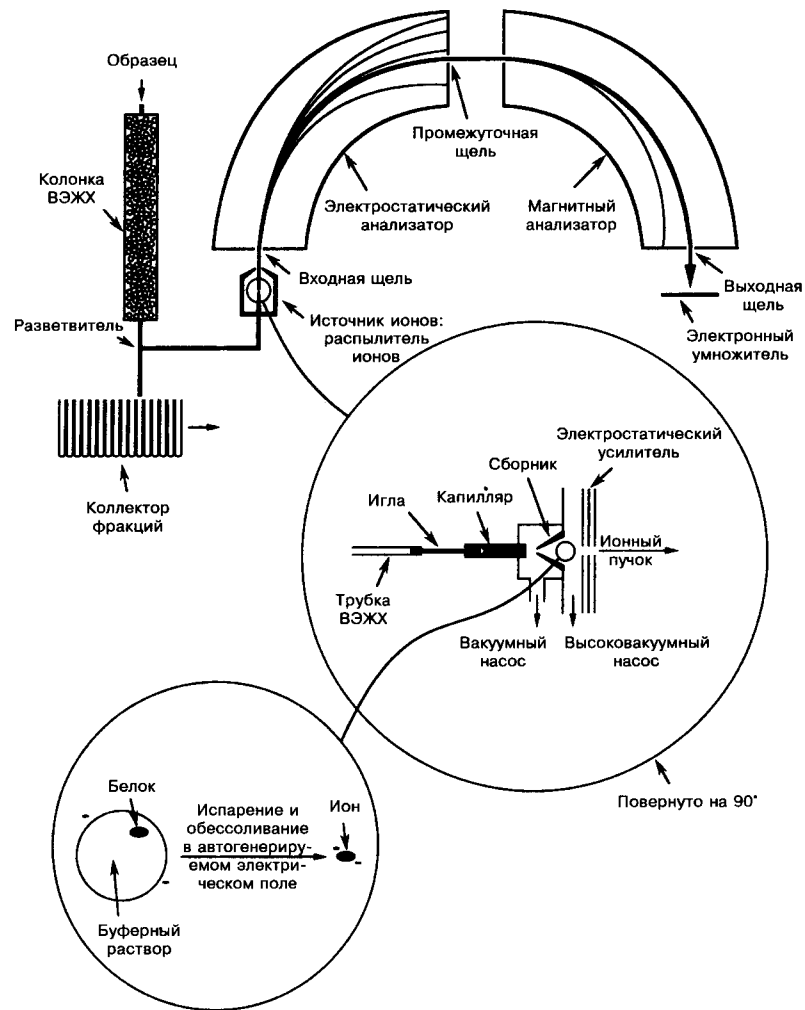


Рис. 3.15. Двухсекторный масс-спектрометр в комбинации с жидкостным хроматографом высокого давления (ВЭЖХ).

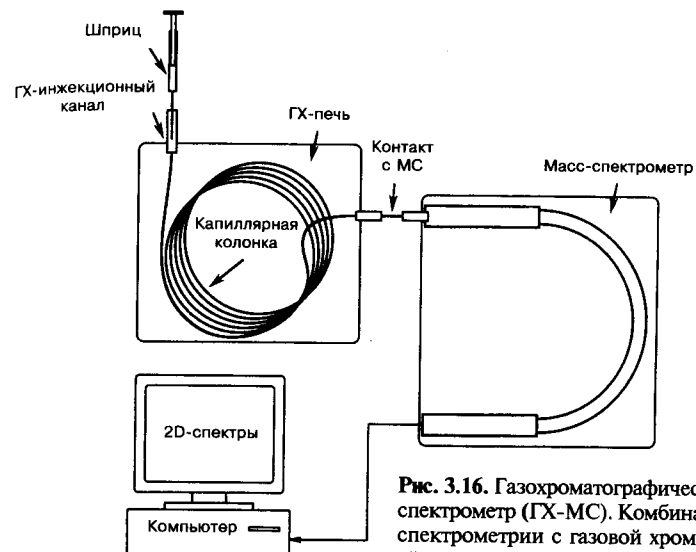


Рис. 3.16. Газохроматографический масс-спектрометр (ГХ-МС). Комбинация масс-спектрометрии с газовой хроматографией может значительно улучшить разрешение при анализе сложных смесей.

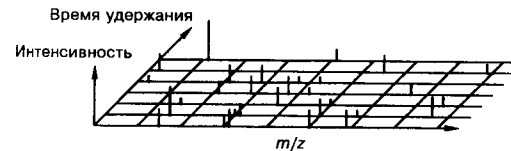


Рис. 3.17. Пример двухмерного спектра ГХ-МС.

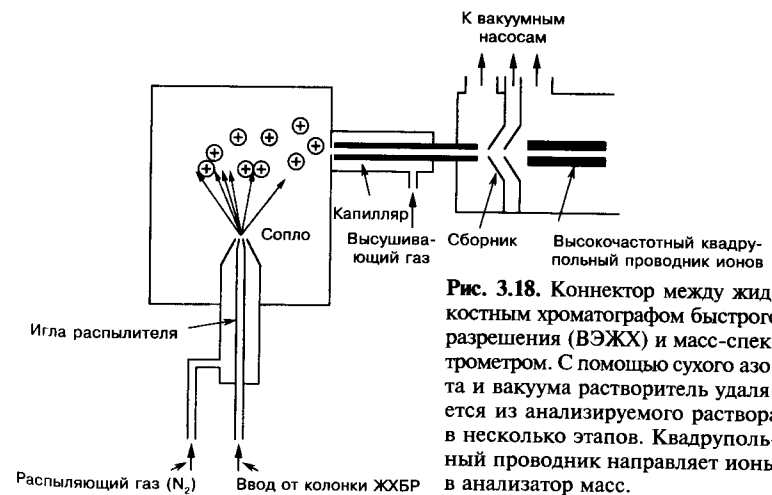


Рис. 3.18. Коннектор между жидкостным хроматографом быстрого разрешения (ВЭЖХ) и масс-спектрометром. С помощью сухого азота и вакуума растворитель удаляется из анализируемого раствора в несколько этапов. Квадрупольный проводник направляет ионы в анализатор масс.

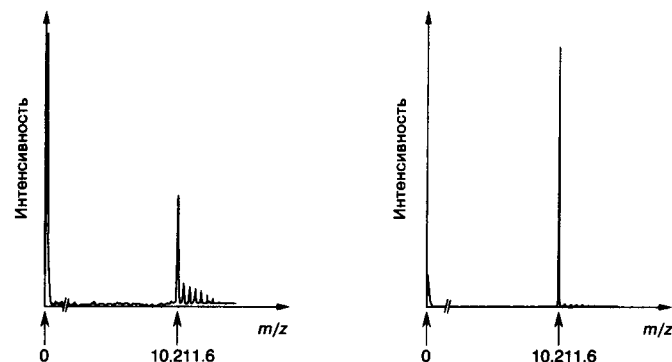


Рис. 3.19. Масс-спектрограмма барстара, 89-членного ингибитора рибонуклеазы барназы (Nölting, 1995, 1997a). Слева: ряд побочных пиков указывает на связывание ионов буфера с высокозаряженным белком. Справа: после снижения концентрации буфера и повышения концентрации белка измерение при pH, близком к pI белка, дает четкую масс-спектрограмму.

3.2. Практические применения

Все более возрастает интерес в быстром обнаружении токсичных и нетоксичных биологических материалов, таких как определенные штаммы бактерий, вирусы и белки. Это привело к разработке специализированных портативных масс-спектрометрических детекторов биологических агентов (Williams et al., 2002) (рис. 3.20—3.27). Чувствительность некоторых из них составляет менее 1 частицы биологического агента в литре воздуха, а время обнаружения не превышает 3 минут.

Другим важным применением МС является обнаружение мутаций в ДНК и секвенирование ДНК (см.⁴ Hung et al., 2002; Köster, 2001a,b) (рис. 3.28), обнаружение мутаций и посттрансляционных модификаций в рекомбинантных белках (рис. 3.29; см. Lee et al., 2002a; Nölting, 1999b, раздел 9.1.2), диагностика болезней (см. Anderson et al., 2002), идентификация белков (глава 9; см. Aitken, Learmonth, 2002), контроль качества белковых препаратов (см. Stephenson et al., 2002), секвенирование пептидов (рис. 3.30 и 3.31; см. Chen et al., 2002a; Katakuse et al., 1982; Nemeth-Cawley, Rouse, 2002; Shevchenko et al., 2002; Shimonishi et al., 1981; Stoeva et al., 2002), протеомный анализ

⁴ Как и ранее, «см.» (смотри, например) означает, что автор цитирует работы выборочно, по своему усмотрению. В большинстве случаев это наиболее характерные отобранные им (чаще всего новейшие) примеры.

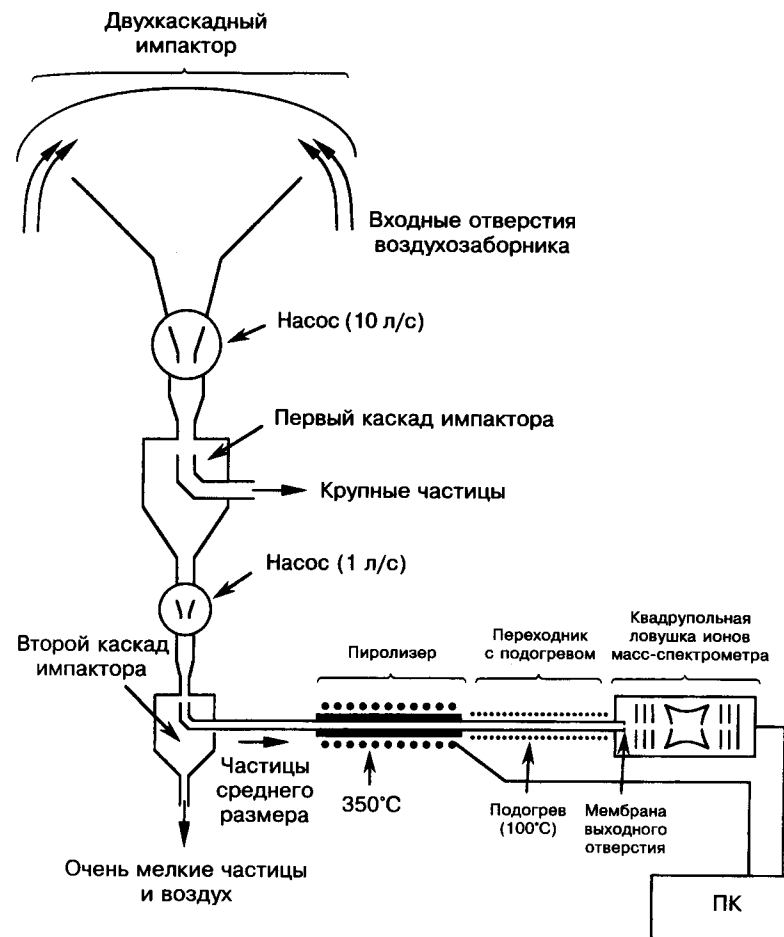


Рис. 3.20. Масс-спектрометрический детектор биологических агентов состоит из импактора (воздухозаборника с сепаратором аэрозольных частиц), пиролизера и масс-спектрометра. Двухстадийный импактор отбирает аэрозольные частицы по размеру в определенном диапазоне, например, 1—10 мкм (см. также рис. 3.21). Эти частицы затем расщепляются пиролизом (см. рис. 3.22) и анализируются в ионной ловушке масс-спектрометра (см. рис. 3.24—3.27). Подобную конструкцию имеет также химико-биологический масс-спектрометр (ХБМС) от Bruker Daltonik, Бремен, Германия.

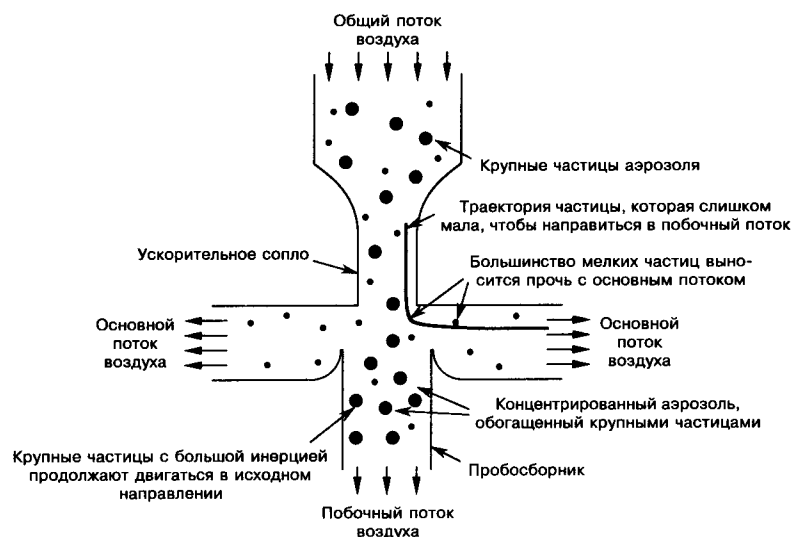


Рис. 3.21. Принцип действия однокаскадного импактора. Устройство расщепляет общий поток аэрозоля на два: основной и побочный. Поскольку направление основного потока воздуха перпендикулярно исходному потоку, то с основным потоком уносятся только частицы с размером, меньшим заданной пороговой величины. В противоположность им крупные частицы из-за своей большой инерции сохраняют начальное направление и движутся с побочным потоком, в котором содержание мелких частиц уменьшено (Magple, Chein, 1980; Magple et al., 1998).

(глава 9; см. Giffin et al., 2001; Kersten et al., 2002; Lim et al., 2002; Nyman, 2001), исследование свертывания молекул белка (см. Biolo et al., 2002; Canet et al., 2002), конформационный анализ белков (см. Favier et al., 2002; Grandori et al., 2002), белок-белковые взаимодействия (см. Powell et al., 2002; Zal et al., 2002) и поиски внеземной жизни (рис. 3.32; см. Schwartz., 1995).

Для анализа высокосложных биологических систем исключительно полезной оказывается пиролитическая масс-спектрометрия (ПиМС). В этом методе образец подвергается частичному пиролитическому разложению на компоненты, которые затем анализируются масс-спектрометрически. Масс-спектры пиролізатов биологических систем могут содержать свыше 100 линий, что позволяет выявлять очень тонкие различия между различными образцами. ПиМС используют для обнаружения вирусов, бактериальных клеток и спор и для дифференциации и идентификации различных видов микроорганизмов (Barshick et al., 1999; Freeman et al., 1990; Goodacre et al., 2000; Goodfellow et al.,

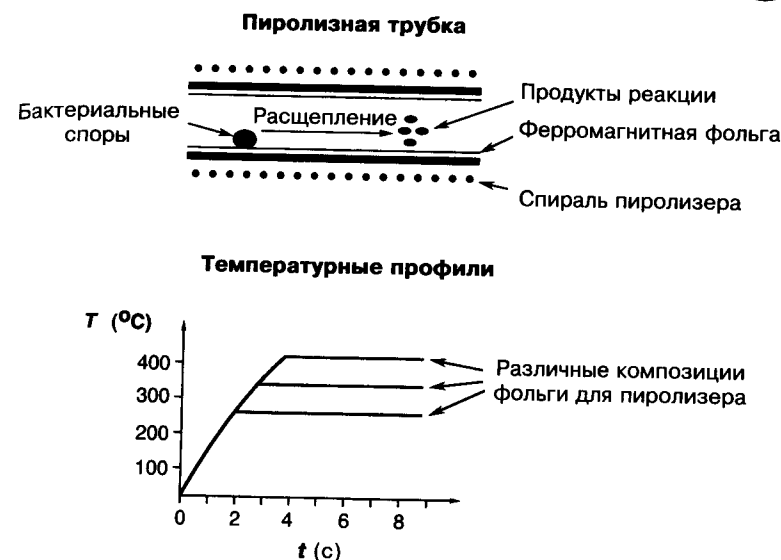


Рис. 3.22. Принцип пироліза. В пиролізную трубку поступает анализируемый образец и через спираль пиролізера пропускается высокочастотный ток. Ток быстро нагревает ферромагнитную фольгу до точки Кюри, при которой фольга обратимо прекращает проявлять ферромагнитные свойства и дальнейшее нагревание прерывается. Подходящими ферромагнитными материалами являются, например, железоникелевые сплавы, полученные в вакууме пиролізаты затем переносятся в масс-спектрометр. Пиролізная масс-спектрометрия (ПиМС) особенно удобна для обнаружения и анализа биологических агентов (Aries et al., 1986; Berkely et al., 1990; Freeman et al., 1995; Goodacre, 1994; Goodacre, Kell, 1996).

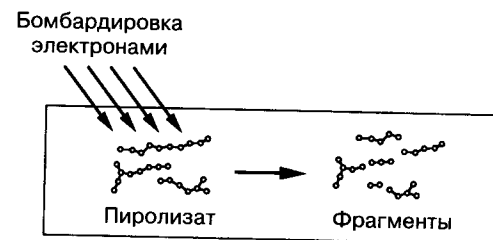


Рис. 3.23. Фрагментация пиролізата с помощью бомбардировки электронами (обычно с энергией около 25 эВ) еще более повышает информационное содержание масс-спектров касательно природы анализируемого биологического агента (см. Ikarashi et al., 1991).

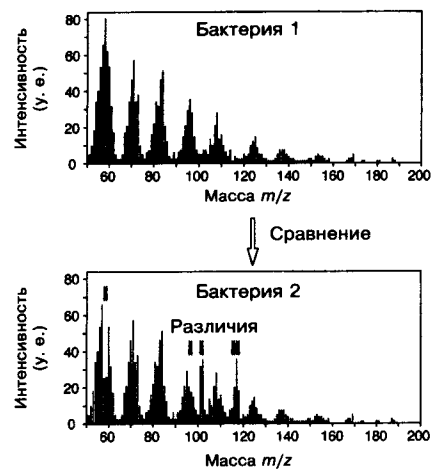


Рис. 3.24. Обнаружение биологической контаминации и дифференциация между различными биологическими агентами с помощью масс-спектрометрии пиролизатов с отношением m/z в диапазоне 50—200 (см. Goodacre, 1994; Goodacre, Kell, 1996).

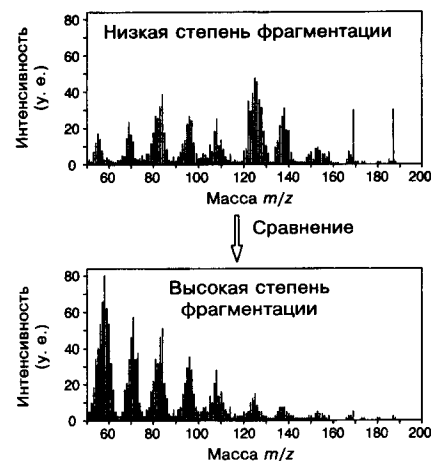


Рис. 3.25. Обнаружение биологической контаминации и дифференциация между различными биологическими агентами путем сравнения масс-спектров пиролизатов с отношением m/z в диапазоне 50—200 при различной степени фрагментации. Фрагментация осуществлена путем бомбардировки атомами гелия в ионной ловушке масс-спектрометра (см. также рис. 3.27).

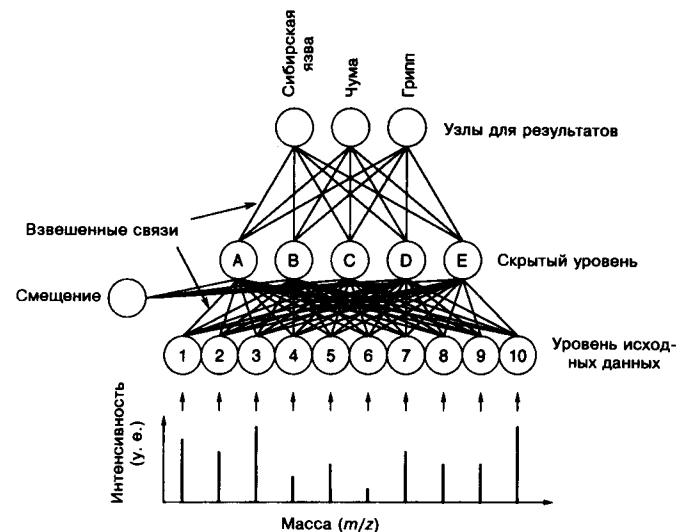


Рис. 3.26. Пример нейронной сети для анализа спектра пиролизной масс-спектрометрии (ПиМС) (Goodacre et al., 1998 a,b). В этом упрощенном примере сеть состоит только из смещения, взвешенных связей, 10 узлов для исходных данных, 5 скрытых узлов и 3 узлов для результатов. В реальности число узлов в исходном уровне будет равно 150 (по одному на каждое значение m/z от 51 до 200). Скрытый уровень может содержать 8—20 узлов. Веса связей и смещение устанавливаются путем контролируемого обучения с использованием опасных веществ, подлежащих обнаружению, или посредством имитаций этих веществ.

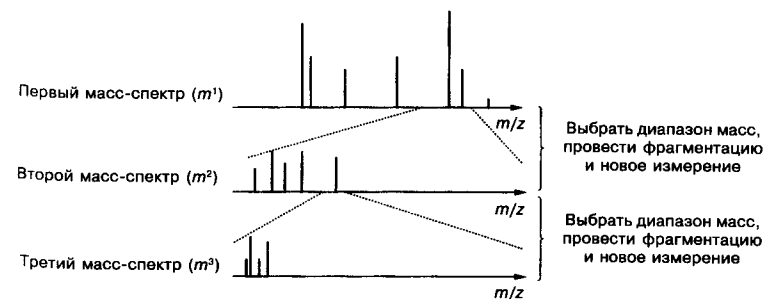


Рис. 3.27. Пример масс-спектрометрии с множественной фрагментацией (m^n) в ионной ловушке масс-спектрометра.

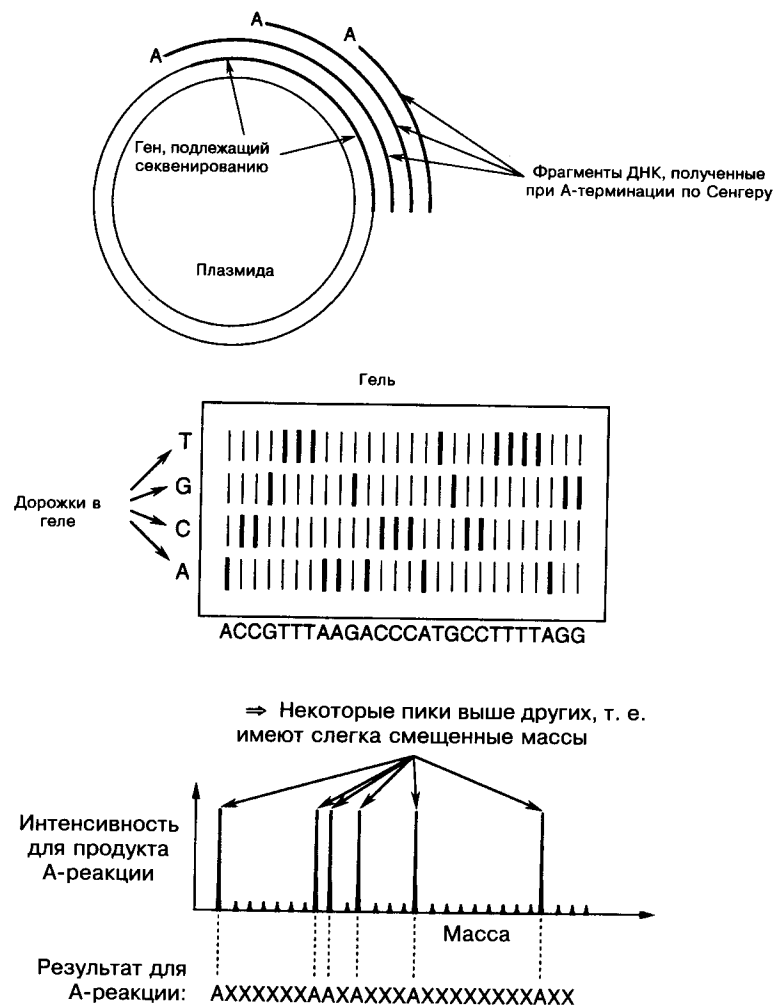


Рис. 3.28. Секвенирование ДНК по Сенгеру методом дидезоксинуклеотидной терминации (Sanger, 1988; Sanger et al., 1977) с масс-спектрометрическим анализом продуктов реакции. *Вверху:* амплификация матрицы ДНК с терминацией (показана только одна из четырех реакций). *В центре:* для сравнения приведены результаты обычного анализа продуктов реакции с использованием электрофореза в полиакриламидном геле. *Внизу:* масс-спектрометрический анализ продуктов реакции А: рисунок пиков масс показывает положение аденина (А) в последовательности.

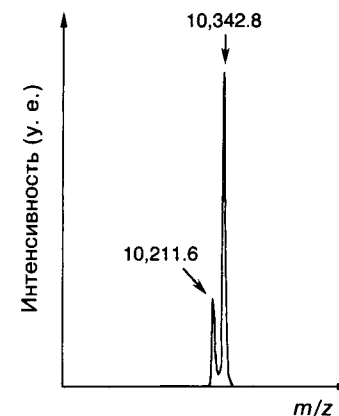


Рис. 3.29. Масс-спектрограмма белка барстара с массой 10 212 Да. Этот белковый препарат содержит фракцию с молекулярной массой на 131 Да выше, чем ожидается. Эта фракция содержит N-концевой метионин, который не полностью отщепился после синтеза белка.

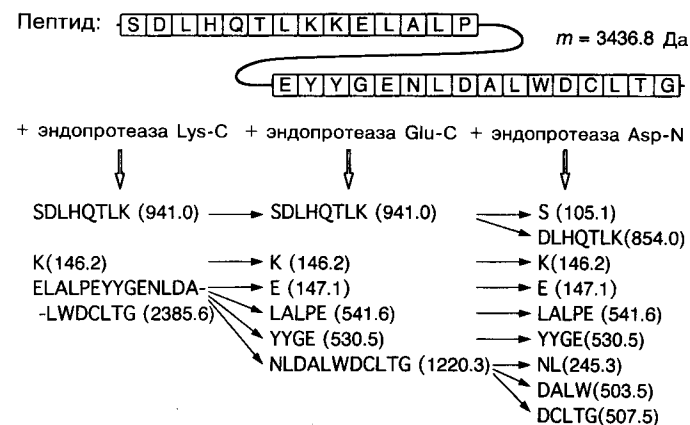


Рис. 3.30. Секвенирование пептида SDLHQLKKELALPEYYGENLDALWDCLTG с помощью протеолитического гидролиза и масс-спектрометрии. Этот пептид соответствует фрагменту спираль₁-спираль₂ в белке бастар (Nölting et al., 1997a). В этом упрощенном примере использованы только три протеазы, и поэтому только часть пептидной последовательности может быть установлена однозначно.

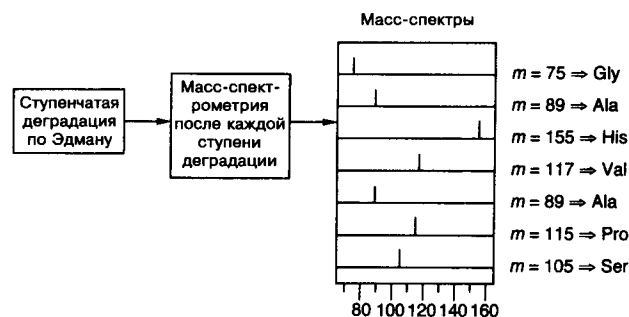


Рис. 3.31. Секвенирование пептида с использованием деградации по Эдману и масс-спектрометрии (Katakuse et al., 1982; Shimonishi et al., 1981): продукты реакции последовательной деградации идентифицируются масс-спектрометрически.

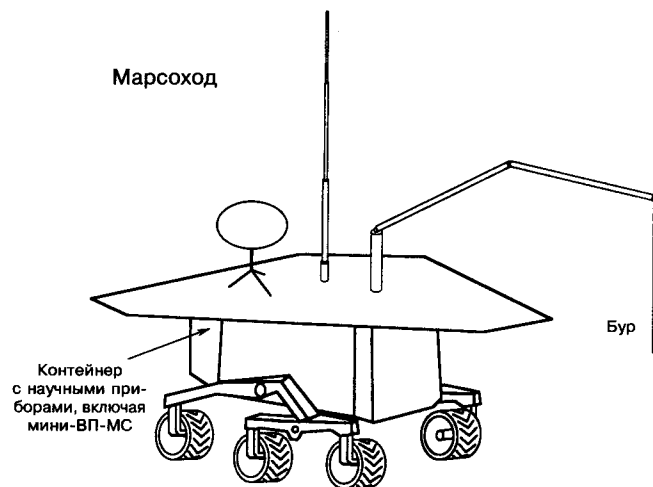


Рис. 3.32. НАСА планирует послать на Марс вездеходы, снабженные масс-спектрометрами. Этот эскиз демонстрирует тележку с мини-времяпролетным масс-спектрометром для поиска внеземной жизни. Уже сейчас масс-спектрометрия используется для поиска внеземных бактерий в метеоритах.

1997; Helyer et al., 1997; Leaves et al., 1997; Magee et al., 1997; Sisson et al., 1991; Snyder et al., 1990, 2001; Sultana et al., 1995; Taylor et al., 1998; Timmins, Goodacre, 1997; Tripathi et al., 2001), для анализа криминалистических образцов и для идентификации личности (Armitage et al., 2001; Ishizawa, Misawa, 1889; Kintz et al., 1995; Sato et al., 2001) и в

многочисленных биотехнологических приложениях (Goodacre, Kell, 1996). Получаемые спектры ПМС можно анализировать с использованием нейронных сетей (рис. 3.26; см. Goodacre et al., 1996, 1998 a,b; Kenyon et al., 1997; Nilsson et al., 1996). Для идентификации биологических агентов с помощью ПМС наиболее подходящими являются ионные ловушки масс-спектрометров, поскольку в них можно непосредственно измерять множественные фрагменты (рис. 3.27).

Добавленная литература

1. Заикин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С. Основы масс-спектрометрии органических соединений. — М.: МАЙК «Наука/Интерпериодика», 2001. — 286 с.
2. Клюев Н.А., Бродский Е.С. Современные методы масс-спектрометрического анализа органических соединений. — Рос. хим. ж. Т. XLVI. № 4, 2002. С. 57—63.
3. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии (Серия «Методы в химии»). — М.: БИНОМ Лаборатория знаний, 2003. — 493 стр.
4. Рамендик Г.И. Рос. хим. ж., т. 44, № 4, 2000. С. 22.
5. Семкин Н.Д., Пияков И.В., Воронов К.Е., Помельников Р.А. Перспективы развития времяпролетных масс-спектрометров для анализа газовых и пылевых частиц. Прикл. Физ. № 2, 2002.
6. Сидоров Л.Н. Масс-спектрометрия и определение массы больших молекул. Соросовский образовательный журнал, Т. 6, № 11, 2000. С. 41—45. <http://www.issep.rssi.ru/cgi-bin/rubr.pl?month=11&year=2000>.
7. Сысоев А.А., Артаев В.Б. Времяпролетные масс-спектрометры: Учебное пособие. — М.: МИФИ, 1990. С. 82.
8. Токарев М. Что такое масс-спектрометрия и зачем она нужна. <http://www.textronica.com>.

История масс-спектрометрии и прочие полезные ссылки: http://ionsource.com/links/ms_links.htm#History.

Представитель хроматографического и масс-спектрометрического оборудования Thermo Electron™: <http://www.textronica.com>.

ГЛАВА 4

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

Рентгеновская кристаллография является методом с значительно доступной в настоящее время разрешающей мощностью при установлении структуры макромолекул и макромолекулярных комплексов. Поскольку техника преобразования Фурье является в этом методе центральной, мы сначала рассмотрим основные аспекты этой техники.

4.1. Преобразование Фурье

Математически преобразование Фурье и обратное ему преобразование Фурье осуществляются между двумя областями (пространствами): r и k . Если, например, r — пространство или время, а k — импульс или частота, то прямое и обратное преобразования Фурье, соответственно, суть:

$$F(k) = (2\pi)^{-0.5} \int_{-\infty}^{\infty} f(r) e^{-2\pi i k r} dr \quad (4.1)$$

и

$$f(r) = (2\pi)^{-0.5} \int_{-\infty}^{\infty} F(k) e^{2\pi i k r} dk \quad (4.2)$$

В качестве иллюстрации на рис. 4.1 приведено одномерное преобразование Фурье. Рис. 4.1, б представляет собой разложение сигнала, показанного на рис. 4.1, а. Это разложение было вычислено как Фурье-преобразование сигнала на рис. 4.1, в. Обратное преобразование сигнала (в) дает в точности сигнал (а). На рис. 4.1, г показан результат Фурье-преобразования сигнала (в) со всеми фазами, приравненными нулю, вместо истинных значений фаз. Сравнение (г) с (а) демонстрирует, насколько важны фазы при преобразованиях Фурье (чтобы при обратном преобразовании получить в точности исходный сигнал, нужно знать и амплитуды, и фазы).

Три примера на рис. 4.2–4.4 иллюстрируют метод двумерного преобразования Фурье. На рис. 4.2, б представлено преобразование Фурье для гексагонального расположения пиков на рис. 4.2, а. На рис. 4.3, а некоторые Фурье-компоненты с низкими амплитудами

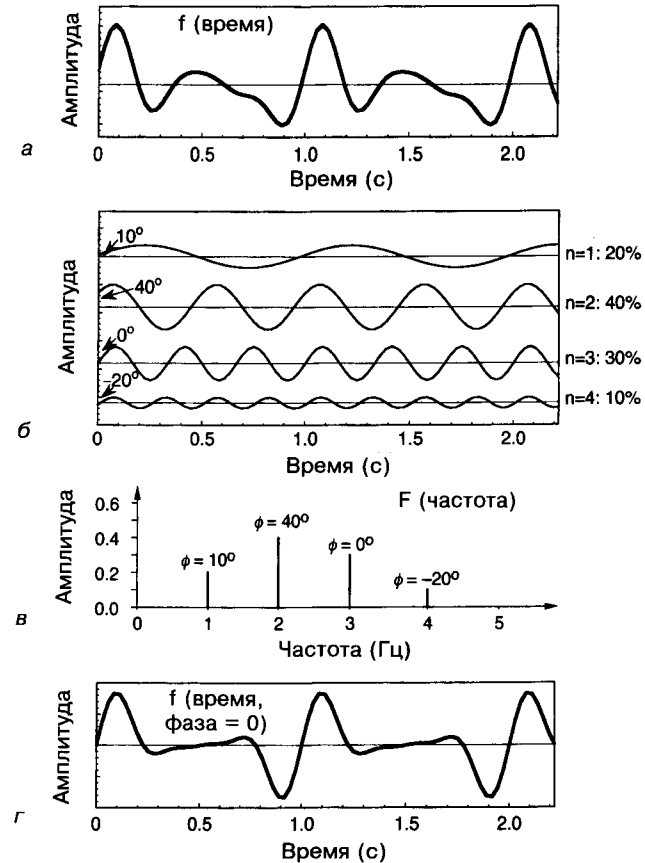
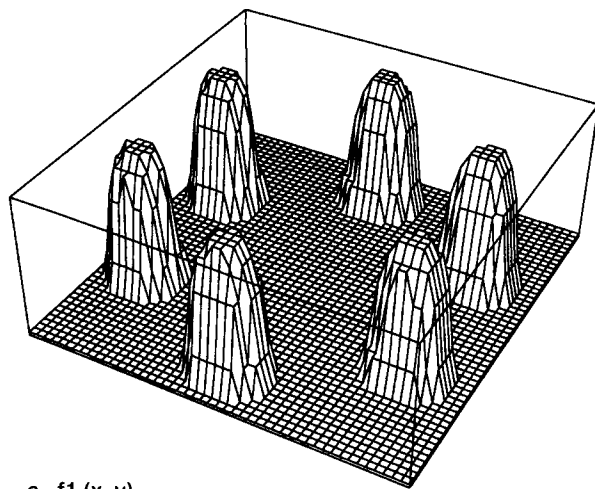


Рис. 4.1. Пример потери фазовой информации при обратном преобразовании Фурье. С правильными фазами четыре частотных компонента (б) при сложении дают сумму (а). Однако, когда складываются четыре компонента с неправильной фазой 0, мы получаем неправильную сумму (г). На графике (в) показано Фурье-преобразование для (а). На графиках (а), (б) и (г) показана лишь часть функции; полная функция является периодической в интервале $(-\infty, \infty)$. FT — прямое преобразование Фурье.

приравнены к нулю, и, тем не менее, обратное Фурье-преобразование (рис. 4.3, б) показывает, что при этом сохраняется практически вся информация. Поэтому Фурье-преобразование зашумленных сигналов, когда некоторые их части с низкими амплитудами зануляются и производится обратное Фурье-преобразование изначально преобра-

а $f_1(x, y)$

↓ FT

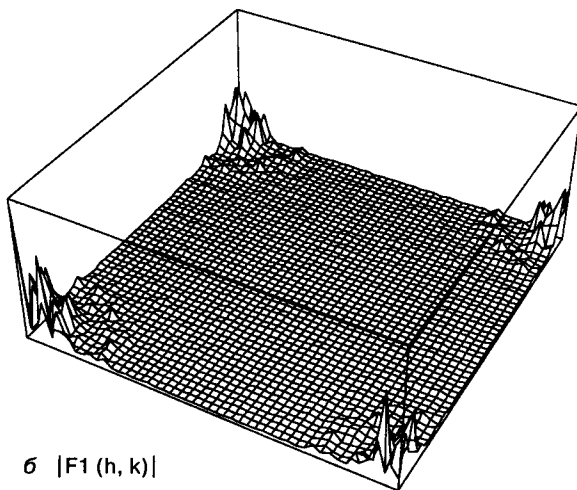
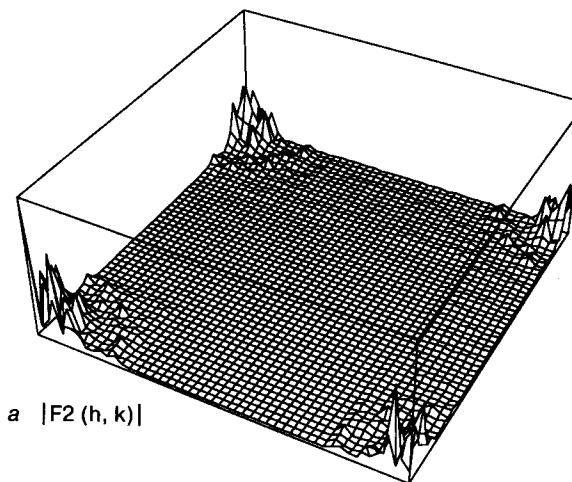
б $|F_1(h, k)|$

Рис. 4.2. Пример двумерного Фурье-преобразования: (б) Фурье-преобразование для (а). На рисунке (б) показаны только абсолютные значения функции. Следует, однако, иметь в виду, что полная функция содержит амплитуду и фазу для каждой координатной точки (ср. рис. 4.1).

а $|F_2(h, k)|$

↓ FT⁻¹

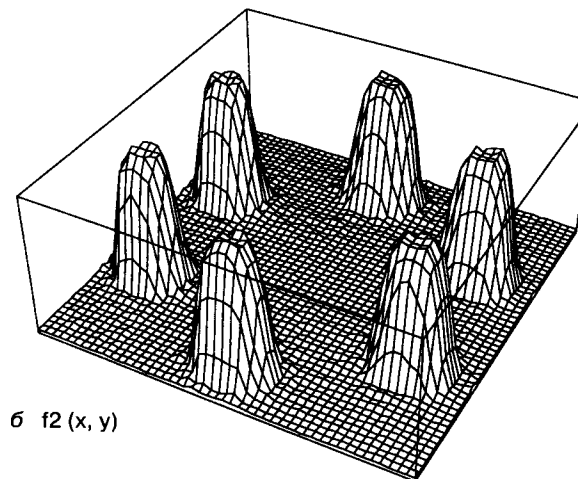
б $f_2(x, y)$

Рис. 4.3. Пример двумерного Фурье-преобразования. На рисунке (а) изображения по углам идентичны таковым на рис. 4.2, б, но в середине координатного пространства компоненты с низкими амплитудами приравнены нулю. На рисунке (б) представлено обратное преобразование Фурье для (а). Можно убедиться, что (б) почти идентичен исходному рис. 4.2, а, т.е. удаленные компоненты с низкими амплитудами не содержат много информации. Заметьте, что на этом рисунке изображены только абсолютные значения функции. FT⁻¹ — обратное Фурье-преобразование.

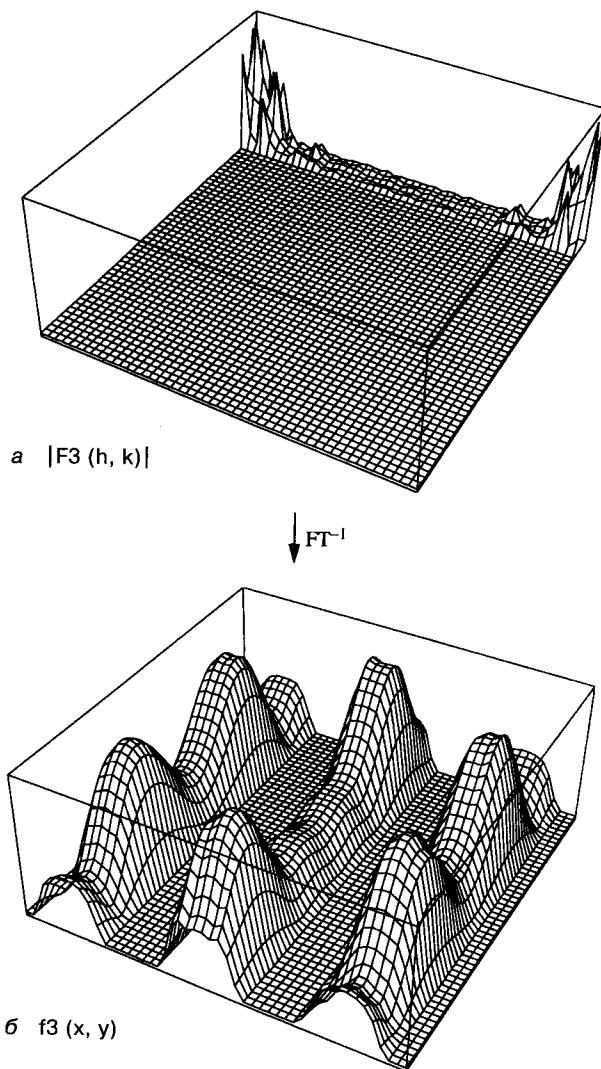


Рис. 4.4. Пример двухмерного Фурье-преобразования. На рисунке (а) представлен тонкий срез функции из рис. 4.2, б с дополнением полного среза всех компонентов, приравненных к нулю. На рисунке (б) представлено обратное Фурье-преобразование для (а): некоторые детали функции все еще сохраняются в (б), но много информации потеряно. Заметьте, что на этом рисунке изображены только абсолютные значения функции.

зованных сигналов, является эффективным методом для снижения шумов. Рис. 4.4, а и 4.4, б показывают, что происходит, когда для вычисления обратного преобразования Фурье используется лишь его малая часть. Если для реконструкции используются слишком малые Фурье компоненты, то вдоль координат этих компонент наблюдаются существенные искажения.

Почему Фурье-преобразования столь важны для рентгеновской кристаллографии? Да потому, что получаемая дифракционная картина кристалла (рис. 4.5) или любого иного физического объекта является Фурье-преобразованием его структуры (см. также далее рис. 4.10).

Чтобы понять, почему дифракционная картина физического объекта является его Фурье-преобразованием, рассмотрим дифракцию волны от единичного объекта (рис. 4.6) и от двух точечных объектов, разделенных пространством r (рис. 4.7). Вектор рассеяния S определяется как $S = s/\lambda - s_0/\lambda$, где s , s_0 и λ — суть вектор падающей волны, вектор

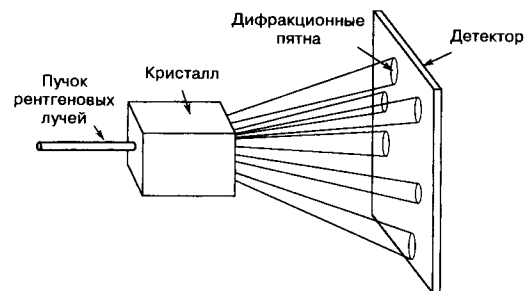


Рис. 4.5. Пример эксперимента по дифракции на кристалле. Картина дифракции рентгеновых лучей кристалла регистрируется с помощью плоскостного (двухмерного) детектора. Картина состоит из большого числа дискретных пятен.

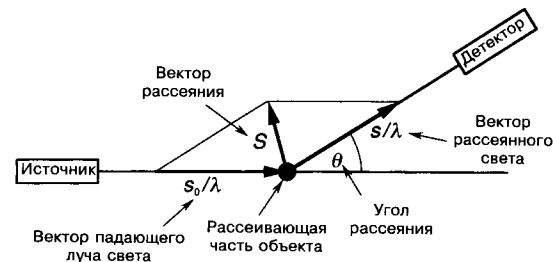


Рис. 4.6. Дифракция волны, вызванная единичным участком объекта.

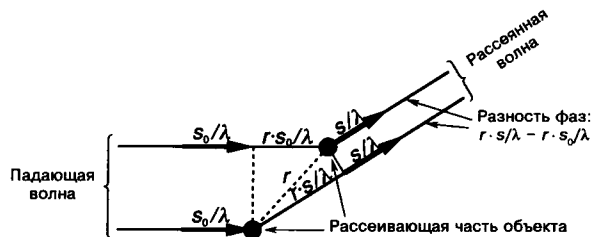


Рис. 4.7. Дифракция волны, вызванная двумя объектами с одинаковой силой рассеяния.

дифрагированной волны и длина волны, соответственно (рис. 4.6). Тогда разность фаз между этими двумя волнами, выраженная в единицах длины волны, как на рис. 4.7, равна: $r s / \lambda - r s_0 / \lambda = r S$. Когда $r S = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$, то происходит конструктивная интерференция, а деструктивная интерференция, т. е. затухание, наблюдается при $r S = \pm 1/2, \pm 2/3, \dots$. Соответственно, дифракционная картина этих двух точек задается выражением: $F(S) = e^{-2\pi i r S}$, где i есть мнимое число: $i \equiv \sqrt{-1}$.

Для нахождения дифракции $F(S)$ макроскопического объекта, состоящего из множества точек, дифрагирующих с различной силой $\rho(r)$, нужно проинтегрировать по всем рассеянным волнам:

$$F(S) = \int_{-\infty}^{\infty} \rho(r) e^{-2\pi i r S} dr. \quad (4.3)$$

По форме (с точностью до константы) это уравнение идентично уравнению для преобразования Фурье (ср. уравнение 4.1). Отсюда электронная плотность и структура белка могут быть получены путем обратного преобразования Фурье их дифракционного изображения.

В микроскопах обратное преобразование Фурье осуществляется линзами (рис. 4.8). К сожалению, в настоящее время нет рентгеновского микроскопа с достаточными разрешением и чувствительнос-

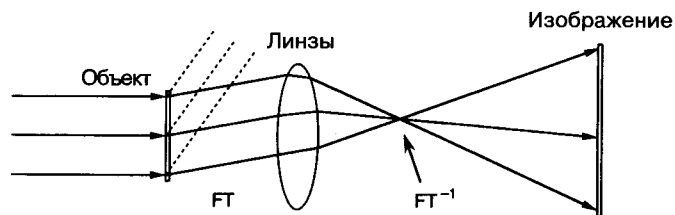


Рис. 4.8. Линзы, проецирующие изображение объекта на экран, создают обратное преобразование Фурье для дифракционной картины объекта. FT — прямое преобразование Фурье; FT^{-1} — обратное Фурье-преобразование.

тью. Из-за радиационного разрушения рентгеновские зеркала не обеспечивают достаточного разрешения, и мы не сможем получить удовлетворительного разрешения для одиночной молекулы белка. Вот почему мы вынуждены регистрировать дифракционную картину белкового кристалла и с помощью компьютера вычислять обратное Фурье-преобразование. К сожалению, при регистрации дифракционной картины с помощью камеры вся информация о фазах теряется. Иными словами, мы не регистрируем преобразование Фурье полностью, но только его часть. Последствия этой серьезной проблемы иллюстрирует рис. 4.1. Таким образом, в дополнение к регистрации дифракционной картины нужна специальная техника, чтобы извлечь также информацию о фазах. В настоящее время для получения такой информации в кристаллографии белков наиболее важным методом является техника замещения тяжелыми атомами (см. раздел 4.1.2.4). Специфика дифракции макроскопических кристаллов состоит в том, что получаются дискретные пятна, а не непрерывная дифракционная картина. Чтобы понять такое поведение, рассмотрим структуру кристалла, представленную на рис. 4.9.

Кристалл белка можно описать как свертку кристаллической решетки и единичной ячейки (рис. 4.9): кристалл = решетка $\times$ единичная ячейка. Единичная ячейка есть наименьшая кристаллическая единица, из которой кристалл может получаться путем простого параллельного переноса. Обычно такая ячейка содержит одну или несколько молекул белка. По теореме свертки преобразование Фурье (ПФ) одновременно для двух функций свертки $f_1(r)$ и $f_2(r)$ есть произведение их Фурье-преобразований:

$$FT(f_1(r) \times f_2(r)) = FT(f_1(r)) \times FT(f_2(r)). \quad (4.4)$$

Таким образом, дифракционная картина белкового кристалла есть Фурье-преобразование единичной ячейки, умноженное на Фурье-преобразование кристаллической решетки. Последнее называется обратной (кристаллической) решеткой (рис. 4.10). Так как значения для

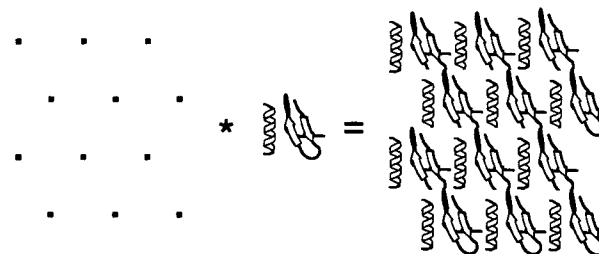


Рис. 4.9. Математически кристалл белка можно описать как свертку кристаллической решетки и единичной ячейки (одна или несколько молекул белка).



Рис. 4.10. Фурье-преобразование кристаллической решетки становится так называемой обратной решеткой. Оно определяет максимальное число и положение наблюдаемых дифракционных пятен.

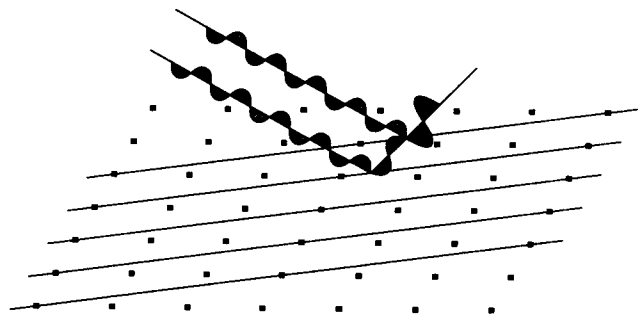


Рис. 4.11. Отражение и дифракция рентгеновых лучей от плоской (двухмерной) кристаллической решетки.

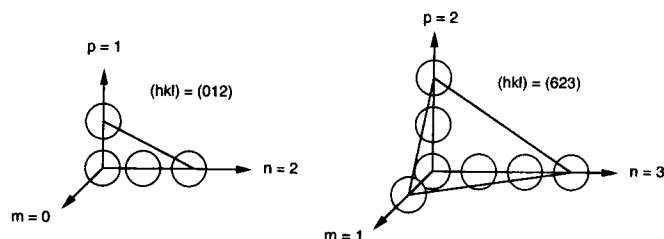


Рис. 4.12. Примеры номенклатуры для миллеровских индексов, hkl . Они определяются как наименьшие целые числа, кратные величинам, обратным к величинам отрезков на осях; при этом $1/0$ принимается равным 0.

обратной решетки вне узлов исходной решетки равны нулю, то дифракционная картина кристалла соответствует Фурье-преобразованию единичной ячейки в узлах обратной решетки.

Существует второй способ объяснить появление дискретных пятен на дифракционной картине макроскопического кристалла и извлечь информацию из интенсивности этих пятен. Дифракцию можно мыслить как отражение рентгеновых лучей от плоскости кристаллической решетки (рис. 4.11). Эти плоскости описываются индексами Миллера (рис. 4.12).

4.2. Рентгеновская кристаллография белков

4.2.1. Предыстория

В 1934 г. Бернал и Кроуфут открыли, что кристалл пепсина дает четкую картину дифракции рентгеновых лучей (Bernal, 1939; Bernal, Crowfoot, 1934). Потребовались три десятилетия и появление компьютеров, чтобы получить первые трехмерные (3D) структуры белков (Kenfrew et al., 1960; Perutz et al., 1960). С тех пор установлены нативные структуры нескольких тысяч белков. Примеры представлены на рис. 1.6—1.8. Для нескольких белков структура определена в неприродных условиях, например, в органических растворителях (Schmitke et al., 1997, 1998).

4.2.2. Получение подходящих кристаллов

Для рентгеноструктурного анализа нужно иметь кристалл подходящей геометрии и размера (рис 4.13—4.16). Коммерческие комплекты (наборы, киты) реактивов, которые содержат наиболее подходящие буферные растворы, могут быть получены, например, от JenaBioScience (Йена, Германия). Важными параметрами для грубого слежения и тонкой доводки являются концентрация белка, тип и концентрация соли, pH, тип и концентрация поверхностно-активного вещества и прочие добавки, а также температура и скорость кристаллизации¹.

Изначально обычно используют концентрацию белка в диапазоне 2—50 мг/мл. Желательно, чтобы белок или вирус не содержали значительного количества примесей, таких как другие белки или вирусы, их фрагменты, развернутые или неправильно свернутые белки, посторонние частицы, химические добавки, не необходимые для стабильности или растворимости. В большинстве случаев лучше кристаллизуются компактные белки, которые не содержат гибкие концы, такие как гистидиновые зацепки или нативные бесструктурные пептиды. Подходящие кристаллы имеют размеры в несколько десятых долей миллиметра ($>0,1$ мм).

¹ Иногда кристаллы белка удается получить лишь после опробования более тысячи различных условий кристаллизации (см. Попов и др., 1996, с. 141).

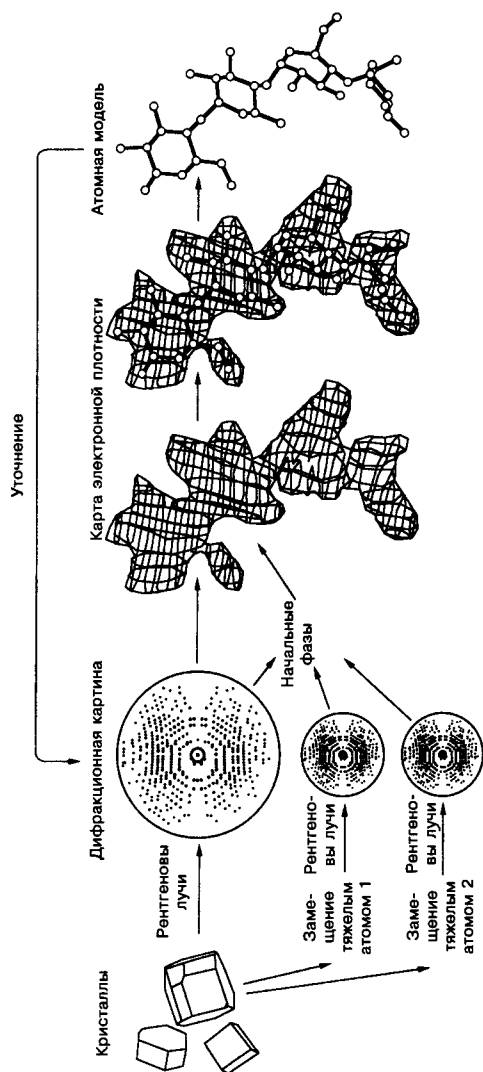


Рис. 4.13. Основная схема рентгенокристаллографического анализа белков. Из измерений дифракционной картины нативного кристалла, а если нужно, то и кристалла, замещенного тяжелым атомом, вычисляется электронная плотность, и строится атомная модель. Исходная модель уточняется, путем ее модификаций до тех пор, пока вычисленная дифракционная картина не совпадет с измеренной картиной.

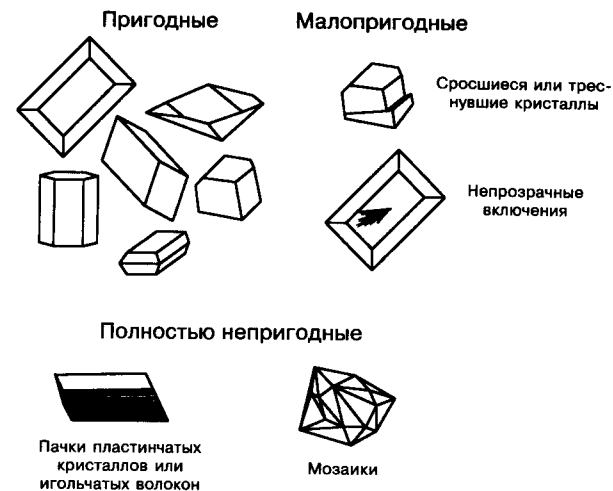


Рис. 4.14. Кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа, должны быть прозрачными и однородными по цвету или по показателю преломления. Кристаллы с трещинами, помутнениями, непрозрачными включениями, сросшиеся кристаллы обычно мало пригодны для рентгеновской кристаллографии. Абсолютно непригодными являются образования в виде пачек пластинчатых, игольчатых или волокнистых кристаллов или мозаичные.

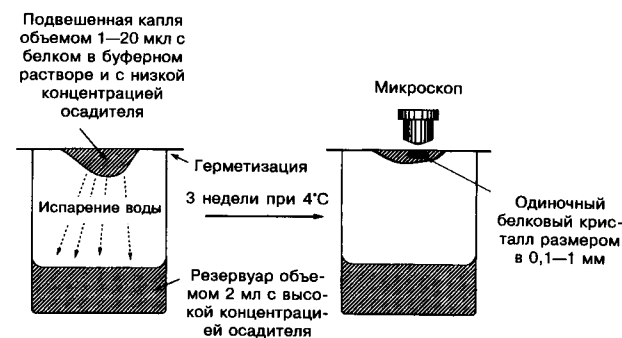


Рис. 4.15. Метод подвешенных капель. Небольшую каплю раствора белка или вируса помещают на покровное стекло и дают ей постепенно испаряться. При правильно подобранных условиях вырастает одиночный кристалл нужного размера.

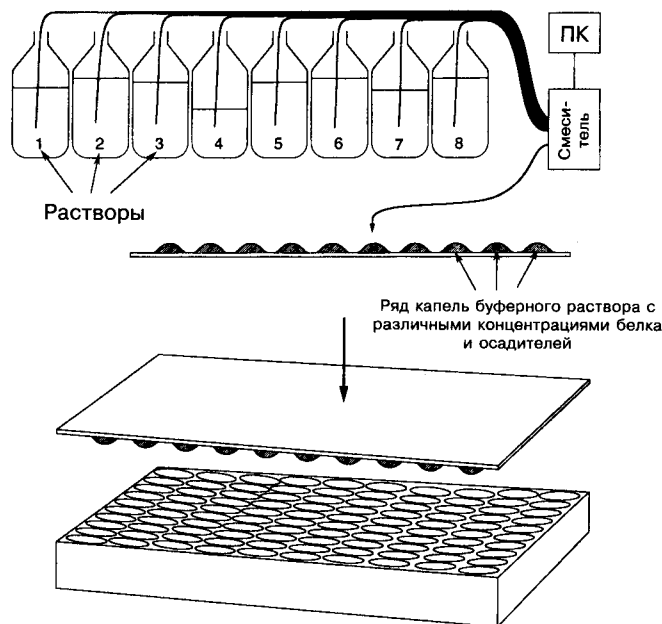


Рис. 4.16. Роботизированная установка для кристаллизации в подвешенных каплях. Под контролем компьютера смеситель отбирает из флаконов различные растворы, смешивает их в различных отношениях и помещает эти смеси на стеклянную пластину.

4.2.3. Получение дифракционной картины

Для получения дифракционной картины кристалла (рис. 4.17–4.19) обычно используют многопроводные (многоволоконные) детекторы или приборы с зарядовой связью (ПЗС)² (рис. 4.20). Основной принцип действия ПЗС (на примере линейного ПЗС) иллюстрирует рис. 4.21.

² Прибор с зарядовой связью (ПЗС) — основа современной цифровой фото- и видеотехники — устройство, накапливающее электронный заряд при попадании на него светового потока. Уровень заряда зависит от интенсивности и продолжительности освещения (см. <http://celler.ru/glossary/?letter=C>; http://www.fotolux.com.ua/article/anatomi_7.htm; <http://www.infectology.ru/microscopy/today/photo.asp>).

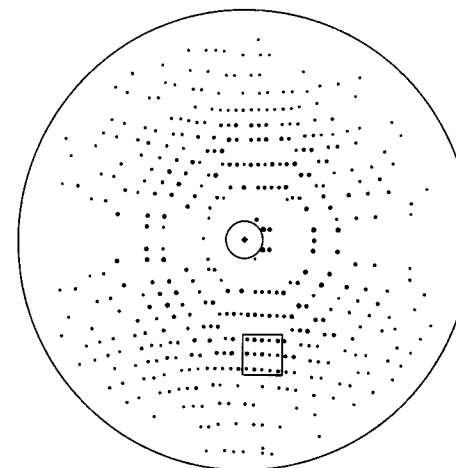


Рис. 4.17. Рентгеновская дифракционная картина белкового кристалла (Norledge et al., 1996). Выделенная область представлена далее в увеличенном виде на рис. 4.26.

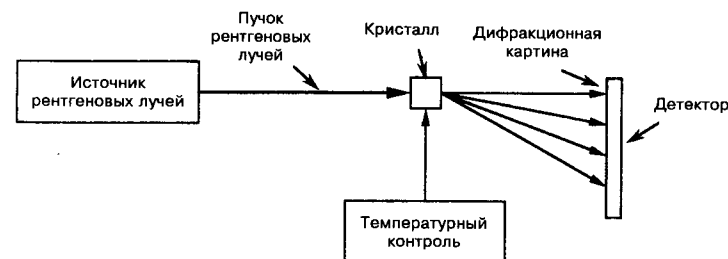


Рис. 4.18. Общая схема установки для получения дифракционной картины.

Наиболее общим источником рентгеновых лучей для кристаллографического анализа белков и вирусов являются вращающийся анодный генератор (рис. 4.22) мощностью 5–15 кВт или синхротроны (рис. 4.23 и 4.24). Синхротроны намного дороже, но они обеспечивают большую яркость и тем самым сокращают время измерения. Сокращение времени экспозиции чаще всего гарантирует более высокое качество дифракционной картины, так как снижается разрушение кристалла вследствие его облучения.

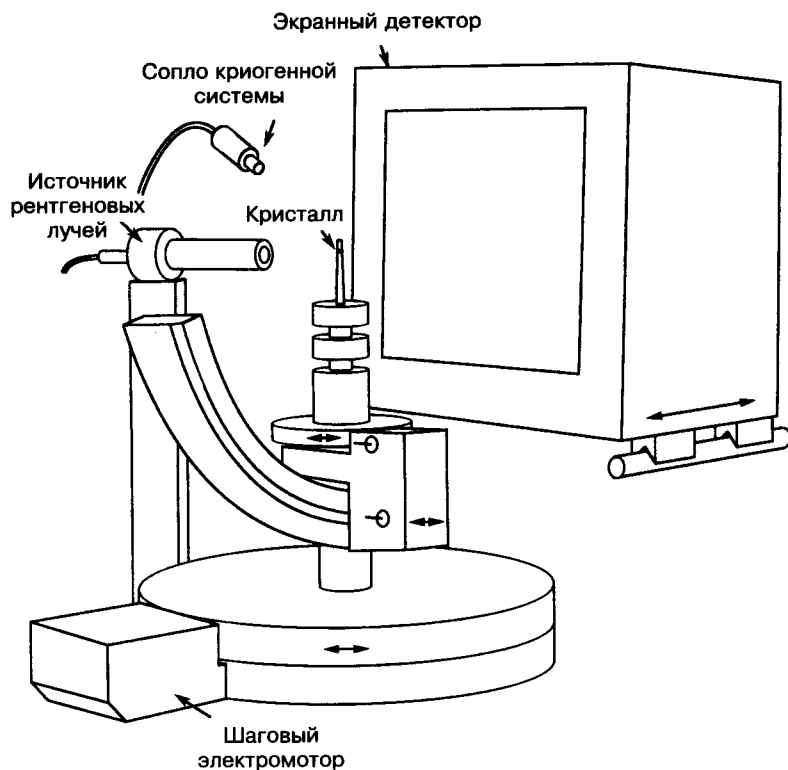


Рис. 4.19. Установка для получения дифракционной картины с экранным детектором (например, от Rigaku, The Woodlands, TX). Кристалл охлаждается азотом через сопло криогенной системы. Охлаждение кристалла снижает радиационное разрушение, но отчасти изменяет межмолекулярные расстояния. Вызванная кристаллом дифракция рентгеновых лучей регистрируется экранным детектором с 2048×2048 или 4096×4096 пикселями (см. рис. 4.20).

Даже самое поверхностное обследование дифракционной картины дает представление о качестве кристалла. Информация о деталях структуры белка наблюдается под большими углами дифракции. Поэтому, если вдали от центра дифракционной картины пятна отсутствуют, то это говорит о низком качестве кристалла и плохом разрешении (рис. 4.25).

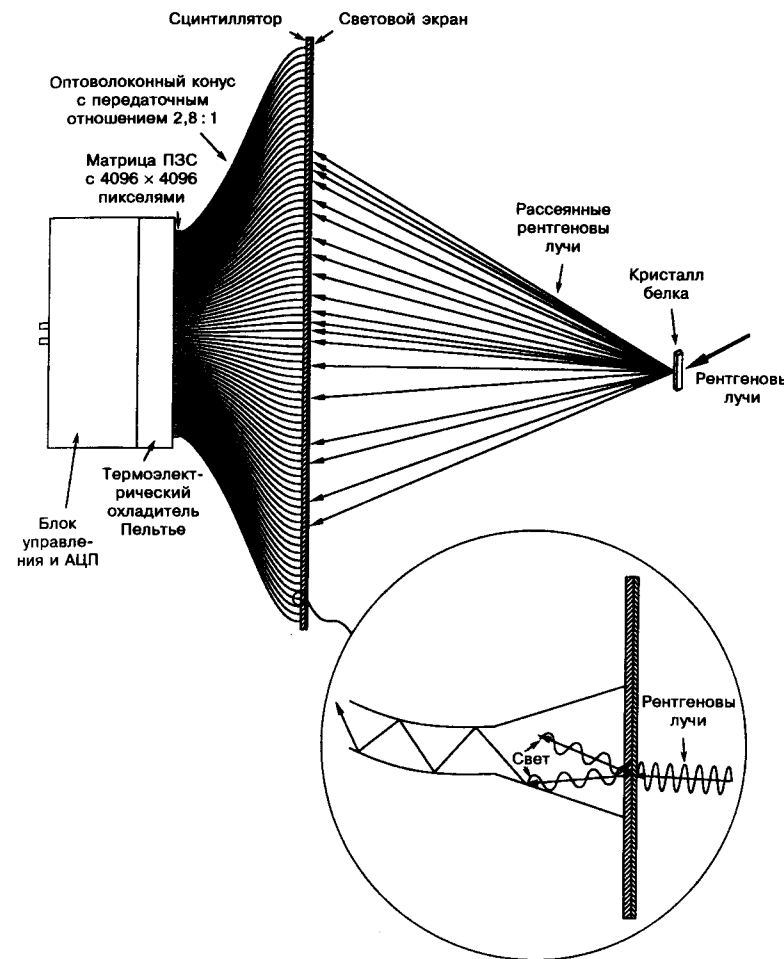


Рис. 4.20. Экранный детектор прибора с зарядовой связью (ПЗС), используемый для регистрации картин дифракции рентгеновых лучей. Для минимизации темнового тока этот ПЗС работает при -40°C , что позволяет детектировать единичные фотоны. Оптоволоконный конус служит также для блокирования рентгеновых лучей и тем самым предотвращает радиационное разрушение чувствительной матрицы ПЗС. При размере пикселя 20×20 мкм общая емкость детектора достигает нескольких сотен тысяч электронов на пиксель, обеспечивая необходимый высокий динамический диапазон. АЦП — аналого-цифровой преобразователь.

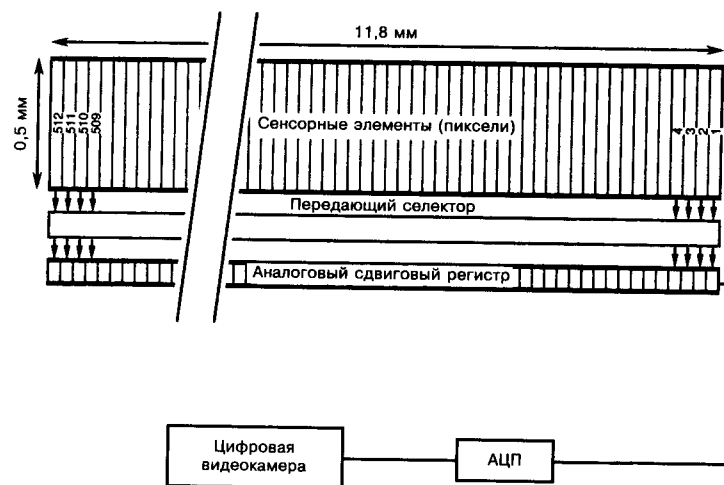


Рис. 4.21. Линейный прибор с зарядовой связью (ПЗС). Сенсорные элементы, поглощая фотоны, генерируют электроны и удерживают их в потенциальных ямах. Спустя некоторое время, накопленные электроны переносятся в аналоговый сдвиговый регистр и регистрируются видеокамерой (Nöling, 1991).

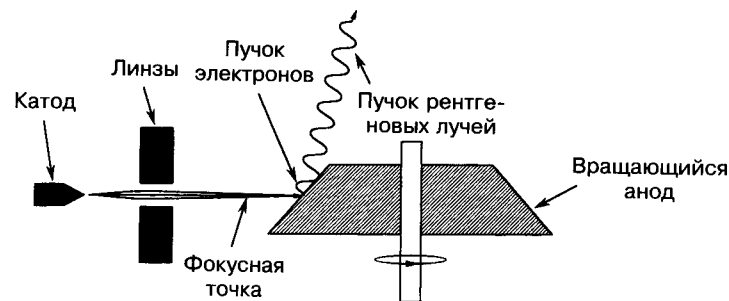


Рис. 4.22. Вращающийся анодный генератор. Пучок электронов фокусируется на вращающемся аноде. Он выбивает электроны из внутренних электронных оболочек анодного металла. Перезаполнение вакантных оболочек электронами с оболочек более высоких уровней сопровождается излучением рентгеновых лучей. Взаимодействие электронного пучка с металлом анода генерирует также большое количество тепла, которое при вращении анода отводится от точки падения электронов и быстро рассеивается.

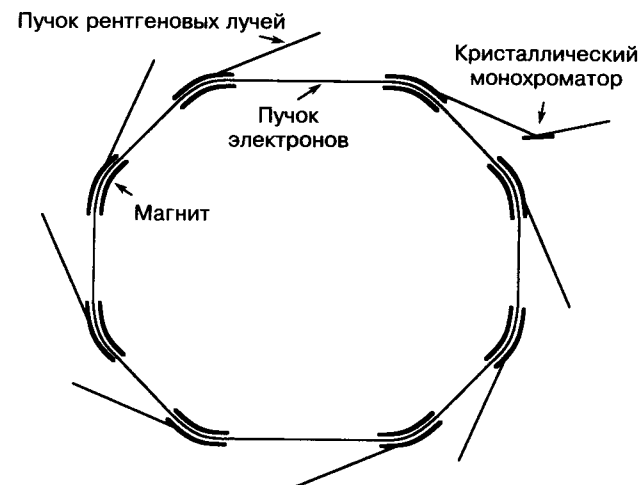


Рис. 4.23. Устройство синхротрона. Ионы или электроны ускоряются до скорости, близкой к скорости света, и направляются по искривленной траектории. В искривленных участках пучка получается излучение с широким спектром. С помощью монохроматора отбирается нужная для кристаллографии белка длина волны, например, 1 Å.

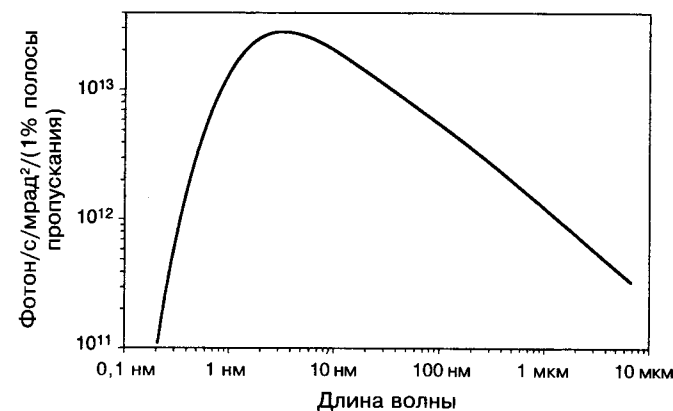


Рис. 4.24. Спектр излучения накопительного кольца берлинского синхротрона электронов (BESSY 1).

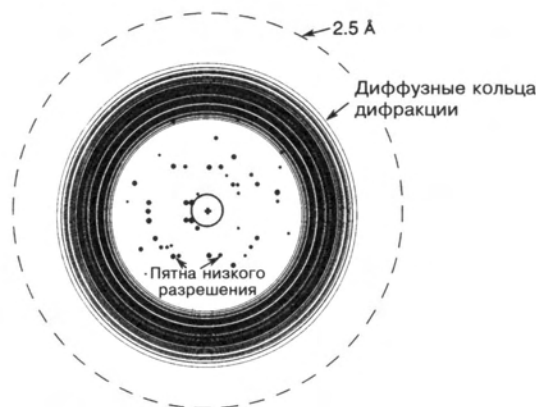


Рис. 4.25. Дифракционная картина плохо рассеивающего кристалла. Всего лишь несколько пятен наблюдаются около центра, любая информация высокого разрешения отсутствует. Пунктирная окружность ограничивает область, соответствующую разрешению в 2,5 Å. Можно видеть, что разрешение в этом случае очень низкое (ср. рис. 4.17).

4.2.4. Определение фаз: включение тяжелых атомов

Как упоминалось ранее, после измерения картины дифракции требуется получить информацию о фазах. Если мы не располагаем информацией о молекулах с похожей структурой или в молекуле нет атомов с аномальным рассеянием, то наиболее предпочтительным методом следует признать замещение тяжелыми атомами³. В этом методе дифракционная картина исходного (нативного) кристалла сравнивается с кристаллами, которые содержат один или несколько тяжелых атомов в фиксированных положениях. Такие кристаллы можно приготовить, например, путем диффузии раствора соли тяжелого атома вовнутрь белкового кристалла.

На рис. 4.26 изображен сегмент дифракционной картины для кристаллов нативного белка и белка с включенными тяжелыми атомами. Знаком «+» отмечены дифракционные пятна, интенсивность которых

³ Строго говоря, речь должна идти не о «замещении», а о присоединении тяжелого атома к поверхности белка без нарушения его молекулярной кристаллической структуры. Необходимым условием является полное сохранение структуры белкового кристалла при введении тяжелых атомов (см. Попов и др., 1996, с. 44).



Рис. 4.26. Сегмент дифракционной картины белкового кристалла. Слева: «нативный» кристалл. Справа: производное с тяжелым атомом.

в модифицированном белке существенно усилилась. Это свидетельствует о том, что они принадлежат фазам с большой амплитудой. Как мы приходим к такому выводу? На рис. 4.27 в верхней части интерферограммы показана зависимость интенсивности от фазы для двух волн. Когда одну из волн мы немного смещаем (нижняя часть рисунка), на интерферограмме наблюдается большое увеличение интенсивности для больших положительных фаз. Важно при этом, что никаких изменений интенсивности не происходит для фаз, близких к нулю. Таким образом, мы можем заключить, что дифракционные пятна, интенсивность которых при сравнении нативного кристалла и кристалла с тяжелыми атомами, усиливается лишь слегка, принадлежат фазам, близким к нулю или к π . Следовательно, сравнивая интенсивности пятен между нативным и модифицированным кристаллами, мы можем оценить фазы индивидуальных дифракционных пятен. Если использовать только одно производное с тяжелым металлом, то сохраняется неопределенность между двумя возможностями для каждого пятна, но это легко преодолевается, если использовать дериваты с другими тяжелыми металлами.

Другой путь продемонстрировать важность измерения фаз в кристаллографии иллюстрирует рис. 4.28. Атомы с различными фазами и относительными положениями могут создавать дифракционные пятна при тех же позициях. Таким образом, без информации, получаемой от замещения тяжелым атомом или от дифракционных картин для белков с похожими структурами, или иной информации, мы не можем установить структуру белка. Теоретически можно было бы испытывать все возможные фазы и выяснять, ведет ли это к интерпретируемой структуре, но в таком случае для макромолекул потребовалась бы непосильная вычислительная работа.

Следует отметить, что с проблемой потери фазовой информации сталкиваются только при использовании обычных методов регистрации дифракции кристаллов, таких как фотопленки или полупровод-

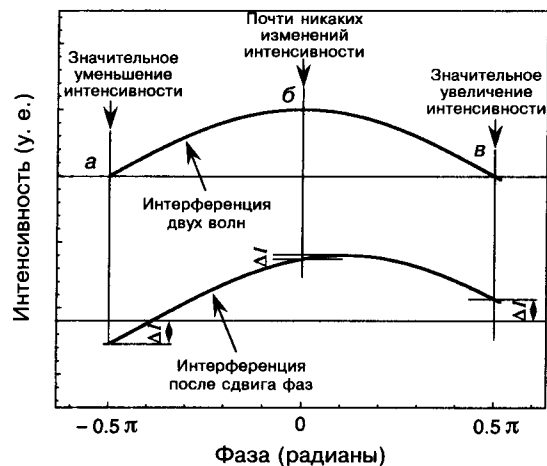


Рис. 4.27. Интерферограмма двух волн. Внутри интервала фаз $[-\pi/2, \pi/2]$ при больших их значениях даже небольшой сдвиг фаз вызывает большие изменения амплитуды ΔI : отрицательные для отрицательных фаз (а) и положительные для положительных фаз (б), но почти никакого изменения амплитуды не происходит при нулевых фазах (в). Следовательно, из большого увеличения амплитуды дифракционного пятна при небольшом сдвиге фаз, вызванном добавлением тяжелого атома, мы можем заключить, что фаза этого пятна имеет большую величину. Таким способом, наблюдая за различными изменениями интенсивности дифракционных пятен, вызванных дериватизацией кристалла тяжелым атомом, можно оценить фазы. Однако во всем фазовом интервале $[-\pi, \pi]$ каждому изменению амплитуды будут соответствовать по две фазы (здесь не показано). Эту неопределенность удастся устранить, используя данные о дифракции кристалла, модифицированного другим тяжелым атомом.

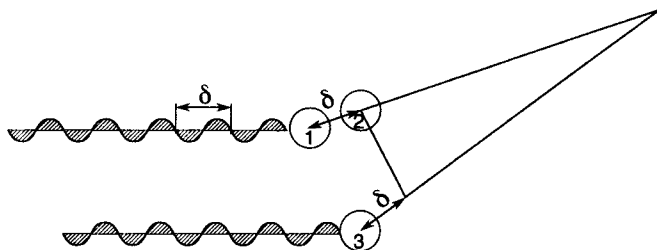


Рис. 4.28. Различные фазы и относительное расположение могут вызывать дифракционное пятно в одном и том же месте. Пара атомов (1,2) и (2,3) с совершенно различным относительным расположением вызывает положительную интерференцию в одном и том же месте.

никовые детекторы. Использование линз или зеркал для получения изображений, подобных изображениям в микроскопе, могло бы предотвратить потерю такой информации (см. рис. 4.8). К несчастью, на сегодня мы не умеем создавать линзы, пригодные для фокусирования рентгеновых лучей с длиной волны в несколько ангстрем. Поверхность обычных линз недостаточно гладкая, и большинство из них действуют подобно несовершенной (дифракционной) решетке. Столь же трудно создать высоко прецизионные зеркала для рентгеновых лучей (рис. 4.29 и 4.30). С помощью микроскопов с зеркалами для рентгеновых лучей, использующих мягкое излучение, удастся достичь разрешения лишь в десятки нанометров (> 10 нм). Более того, разрушительное действие радиации не позволяет достичь атомного разрешения для одиночной белковой молекулы или вирусной частицы.

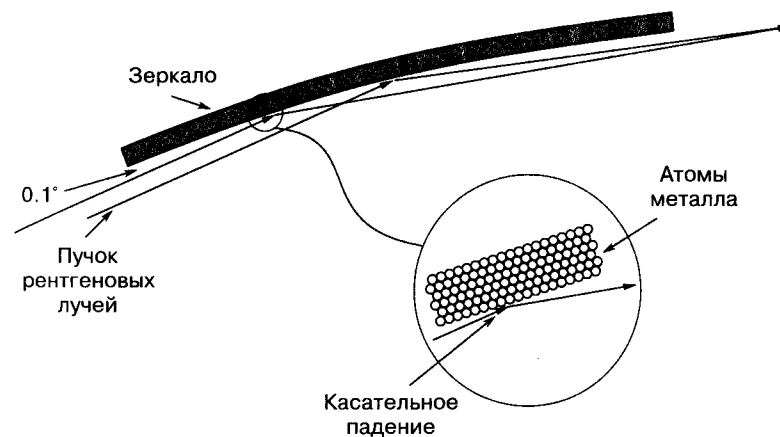


Рис. 4.29. Обычные зеркала для рентгеновых лучей пригодны только при малых углах падения.

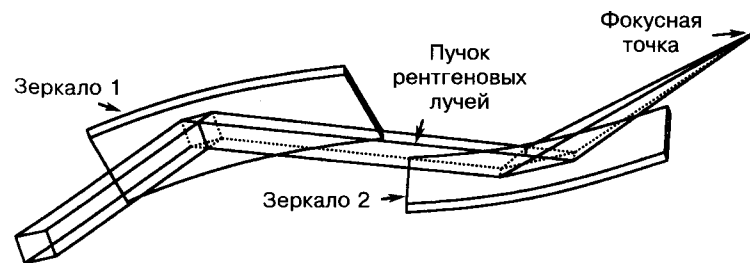
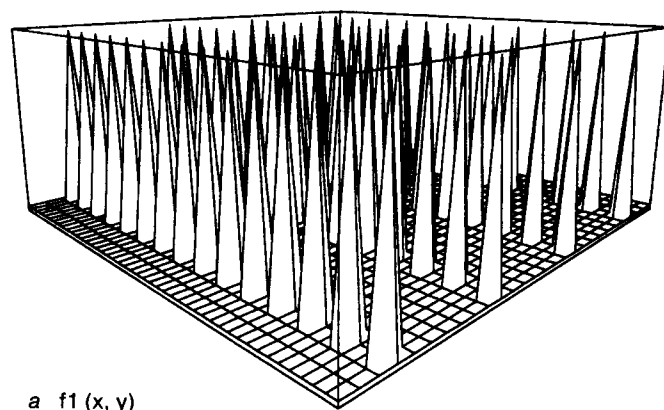


Рис. 4.30. Пара рентгеновских зеркал при скользящем падении фокусирует пучок рентгеновых лучей в одну точку.

Математическая обработка результатов, получаемых методом замещения тяжелыми атомами, иллюстрируется примерами на рис. 4.31—4.34. На рис. 4.31, *a* показан набор ряда атомов. На рис. 4.31, *б* показаны абсолютные значения для Фурье-преобразования этого



↓ FT

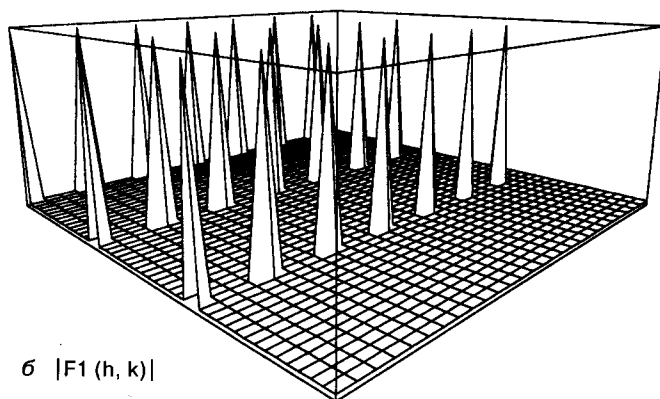


Рис. 4.31. Представление исходной периодической атомной структуры (*a*) и абсолютные значения ее Фурье-преобразования (*б*) FT — Фурье преобразование.

ряда. Из мнимой и реальной частей этого преобразования (рис. 4.32) были вычислены фазы (рис. 4.33). На рис. 4.34, *a* представлен тот же набор, но с одним дополнительным тяжелым атомом, который производит небольшое изменение в преобразовании Фурье. Разность между

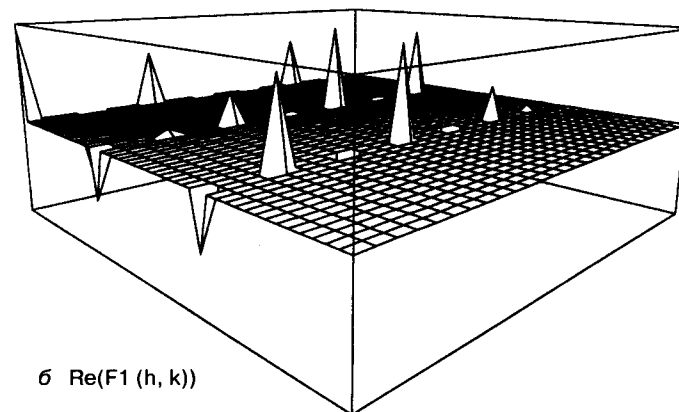
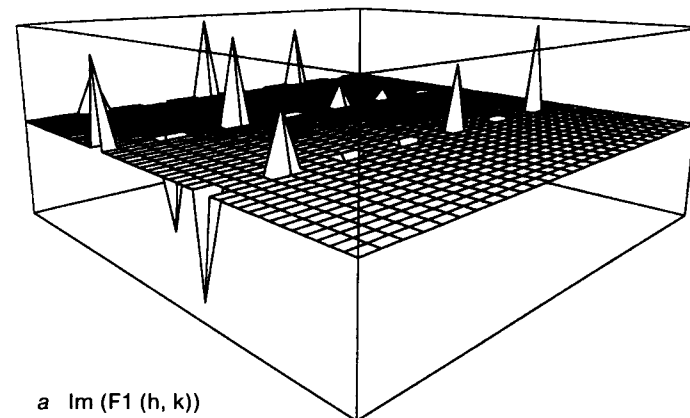


Рис. 4.32. Мнимая (*a*) и действительная (*б*) части Фурье-преобразования атомной структуры, представленной на рис. 4.31, *a*.

абсолютными значениями преобразований Фурье для нативного набора и набора, модифицированного тяжелым атомом, показана на рис. 4.34, б. Сравнивая эту разность абсолютных значений Фурье-преобразования с абсолютными значениями фаз для нативного набора (рис. 4.33, б), мы находим связь между фазами (рис. 4.33, б) и разностями амплитуд

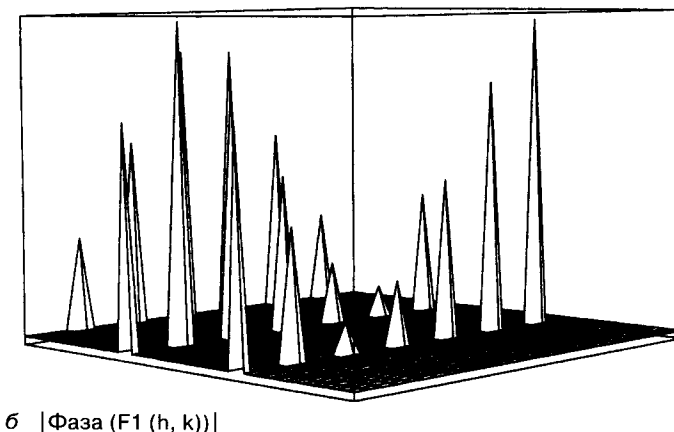
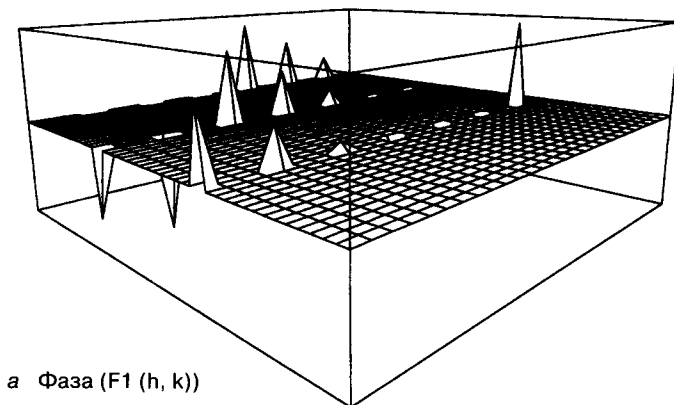


Рис. 4.33. Фаза Фурье-преобразования (а) и ее абсолютное значение (б), вычисленные из его мнимой и действительных частей, представленных на рис. 4.32.

(рис. 4.34, б). Эта связь позволяет определить значения фазовых углов. Как уже говорилось, остающаяся неоднозначность устраняется, если включить данные для второго изоморфного деривата с тяжелым атомом.

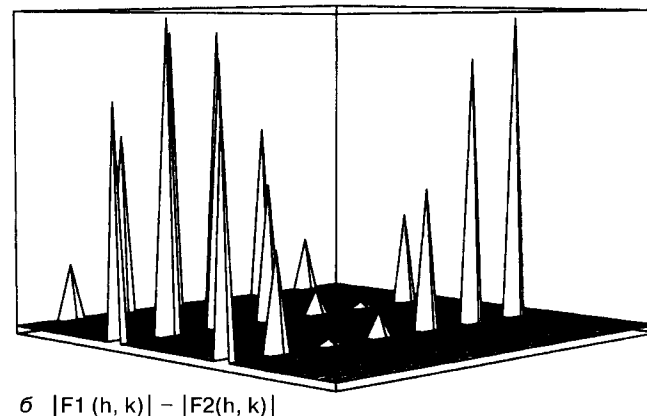
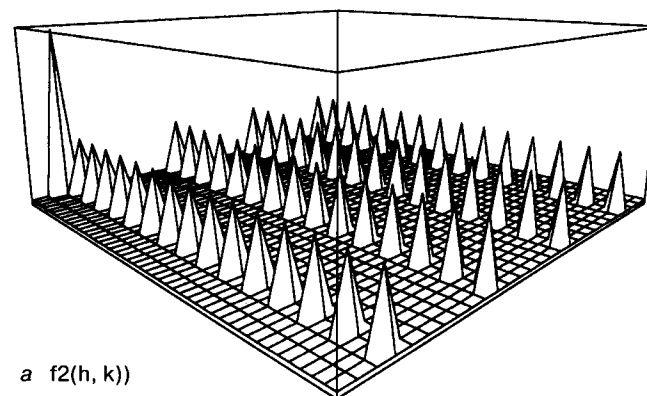


Рис. 4.34. а — представление атомной структуры из рис. 4.31 с замещением одним тяжелым атомом; б — разности между абсолютными значениями преобразования Фурье для нативной структуры (рис. 4.31, а) и той же структуры с замещением тяжелым атомом (рис. 4.34, а). Когда мы сравниваем рис. 4.33, б и 4.34, б, мы можем наблюдать связь между фазами и разностью амплитуд. Заметьте, что $|F| = [(\text{Im}(F))^2 + (\text{Re}(F))^2]^{1/2}$; фаза (F) = $\arctan[\text{Im}(F)/\text{Re}(F)]$, где «Im» и «Re» означают мнимую и реальную части, соответственно.

4.2.5. Вычисление электронной плотности и установление структуры

Программное обеспечение для вычисления электронной плотности и определения структуры на основе дифракционных данных разрабатывается очень быстро в нескольких академических институтах и часто предоставляется бесплатно. Такие программы можно найти в Интернете, проведя поиск по ключевым словам, например: «protein crystallography software».

4.2.6. Криокристаллография и времяразрешающая кристаллография

Структуру короткоживущих конформеров с временами жизни, исчисляемыми микро- и наносекундами, удастся установить с помощью времяразрешающей кристаллографии (рис. 4.35; Genick et al., 1997; Srajer et al., 1996) и криокристаллографии (рис. 4.36; Petsco, Ringe, 2000; Schlichting et al., 2000; Wilmont, Pearson, 2002). Времяразрешающая кристаллография позволяет получать и интерпретировать карты электронной плотности во времени и предоставляет де-

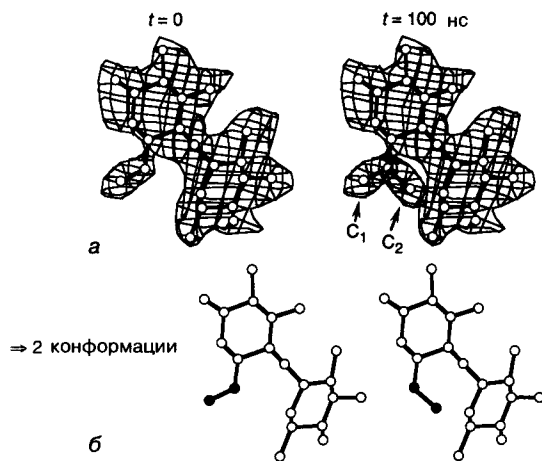


Рис. 4.35. Пример времяразрешающей кристаллографии: изменения электронной плотности через 100 наносекунд после инициации конформационного изменения указывают на наличие двух конформаций C_1 и C_2 .

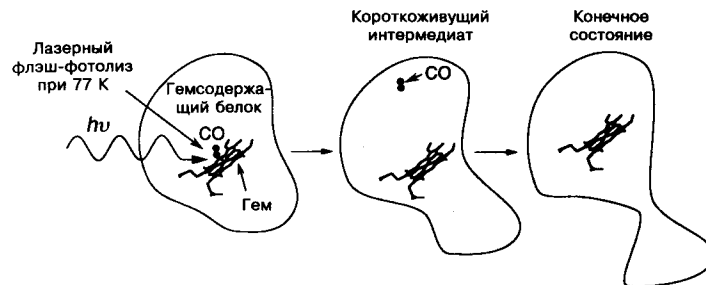


Рис. 4.36. Пример криокристаллографии. Молекула CO «выжигается» (фотолизуется) лазерной вспышкой из гема в молекуле гемсодержащего белка. Это инициирует конформационный переход, который можно зарегистрировать при температуре -196°C .

тельную информацию о структуре короткоживущих интермедиатов при физиологических условиях. В криокристаллографии реакции индуцируются и измеряются при низких температурах. При очень низкой температуре скорость конформационных изменений замедляется на несколько порядков. Это позволяет определять координаты структурных интермедиатов, чего нельзя получить методами обычной рентгеновской кристаллографии. На рис. 4.36 показана схема применения лазерного флэш-фотолиза для получения дифракционной картины в эксперименте.

4.3. Рассеяние рентгеновых лучей

4.3.1. Малоугловое рассеяние рентгеновых лучей

Малоугловое рассеяние рентгеновых лучей (МРРЛ) используется для получения информации о микроструктуре аморфных материалов в масштабе от нескольких ангстрем ($\text{\AA}$) до нескольких микрометров (мкм) (рис. 4.37 и 4.38). На рис. 4.39 показана установка для МРРЛ. Предпринимаются большие усилия для того, чтобы получать надежные измерения под малыми углами. Так как расстояние между разделяемыми рассеивающими точками (Δx) почти обратно пропорционально углу рассеяния (θ), такие измерения необходимы, чтобы получить информацию в относительно больших шкалах длин по сравнению с длиной волны λ рентгеновых лучей ($\Delta x \approx 0,5\lambda \sin^{-1}(\theta/2)$). Детали рентгеновской оптики описаны в предыдущем разделе.

С помощью МРРЛ удалось установить следующие факты:

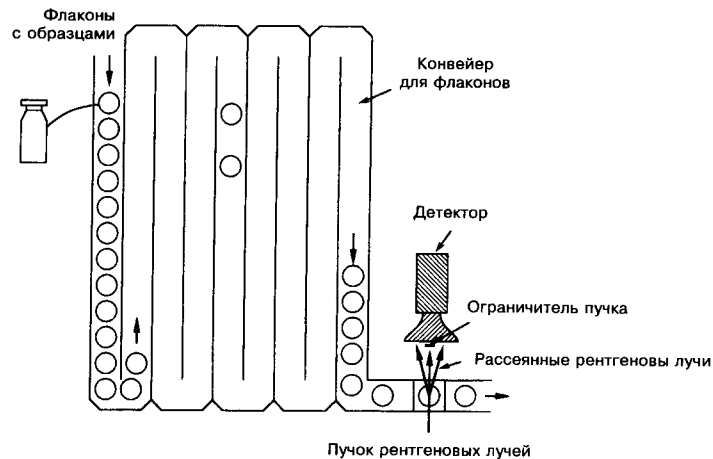


Рис. 4.37. Анализ биологических образцов с помощью автоматизированной установки для измерения малоуглового и широкоугольного рассеяния рентгеновых лучей. Большое число флаконов с образцами анализируется автоматически, и производственный брак обнаруживается незамедлительно.

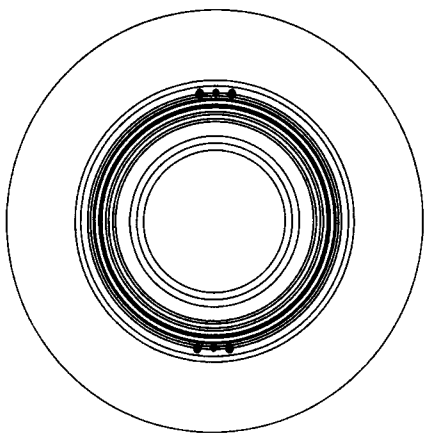


Рис. 4.38. Дифракционная картина клеточной суспензии. С помощью МРРЛ можно получить «отпечаток пальцев» (фингерпринт) для биологического образца определенного вида, и затем использовать его для идентификации неизвестных биологических образцов.

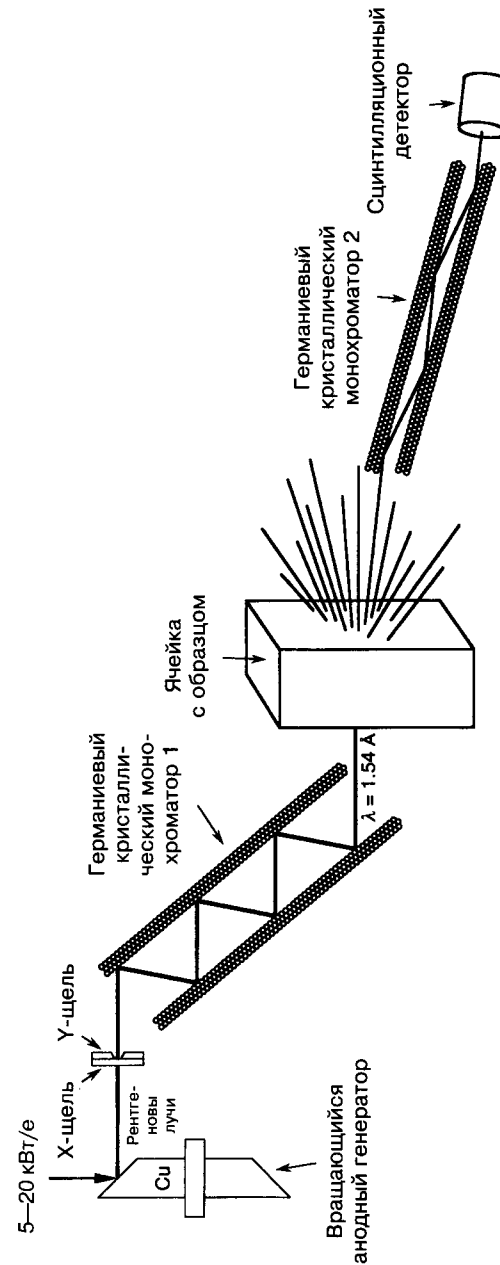


Рис. 4.39. Установка для малоуглового рассеяния рентгеновых лучей (МРРЛ). Пучок рентгеновых лучей, излучаемых вращающимся анодным генератором, проходит сквозь кристаллический монохроматор, который выделяет определенную длину волны. Монохроматический пучок (рентгеновых лучей проходит через ячейку с образцом) и рассеянные лучи под очень малыми углами проходят сквозь второй кристаллический монохроматор и после этого регистрируются сцинтилляционным детектором. Для многих применений эту установку можно упростить, например, выбрав меньшее число отражений в монохроматоре, что даст более высокую интенсивность излучения.

а) без лиганда аспаргаттранскарбамилаза принимает Т-образную четвертичную структуру (Fetler et al., 2002);

б) в молочной железе здоровых женщин осевой период (шаг скручивания) фибрилл коллагена составляет $65,0 \pm 0,1$ нм, а в районах желез, пораженных раком, он на 0,3 нм больше (Fernandez et al., 2002);

в) поперечное сечение микрофибрилл целлюлозы льна составляет скорее всего, $10 \times 50 \text{ \AA}^2$ (Astley, Donald, 2001);

г) основу паутины паука *Nephila* составляют микрофибриллы шелка с шагом скручивания около 8 нм (Miller et al., 1999; Riekel, Vollrath, 2001);

д) размеры домена АТФ-азы SecA составляют примерно $13,5 \times 9,0 \times 6,5$ нм (Dempsey et al., 2002).

С помощью МРПЛ получена информация о конформационном разнообразии и распределении по размеру для развернутых белковых молекул (Choy et al., 2002; Garcia et al., 2001; Kamatari et al., 1999; Panick et al., 1999a). Метод был использован для получения информации об изменениях размера при свертывании белков и пептидов (см. Aitio et al., 2001; Arai, Hirai, 1999; Canady et al., 2001; Chen et al., 1998; Katou et al., 2001; Kojima et al., 2000; Muroga, 2001; Panick et al., 1998, 1999b; Russel et al., 2000; Segel et al., 1999). МРПЛ является одним из немногих методов, который позволяет непосредственно отслеживать структурные изменения небольших вирусных частиц (Perez et al., 2000; Sand et al., 1999).

Размерные ограничения, которые выявляются с помощью МРПЛ можно с успехом использовать для целей предсказания структуры белка путем отбора наиболее подходящих кандидатов (Zheng, Doniach, 2002). В некоторых случаях структуры белков с низким разрешением в растворе были получены исключительно с помощью МРПЛ (Bada et al., 2000; Chacon et al., 1998; Maruyama et al., 2001; Scott et al., 2002; Shilton et al., 1998) или с помощью МРПЛ в комбинации с данными по рассеянию нейтронов (Egea et al., 2001). МРПЛ помогает изучать структуру костей (Rinnerthaler et al., 1999) и выявлять их структурные изменения при болезнях (Grabner et al., 2001). Метод использовался для получения информации о конформационных изменениях ферментов в клеточной стенке бактерий при присоединении к ним субстрата (Schno#nbrunn et al., 1998) и о структурных изменениях в искусственных биомембранах (Riske et al., 2001). Результаты, полученные с использованием МРПЛ, о дентине человека, который представляет собой сложный композит коллагеновых нитей и апатитного минерала богатого карбонатом, согласуются с представлением о нуклеации и росте апатитной составляющей внутри периодических полостей в коллагеновых нитях (Kinney et al., 2001).

4.3.2. Обратное рассеяние рентгеновых лучей

Способность рентгеновых лучей проникать сквозь материалы используется во многих биологических приложениях: от определения молекулярной массы белков до обнаружения органических материалов, спрятанных в металлических контейнерах с помощью измерения возвратного рассеяния рентгеновых лучей (см. рис. 4.40).

Основная проблема при использовании рентгеновых лучей для обнаружения органических материалов, таких как запрещенные наркотики и взрывчатые вещества, состоит в их низком коэффициенте поглощения по сравнению с металлами, а также в возможности маскировать такие материалы путем, например, погружения их в другие

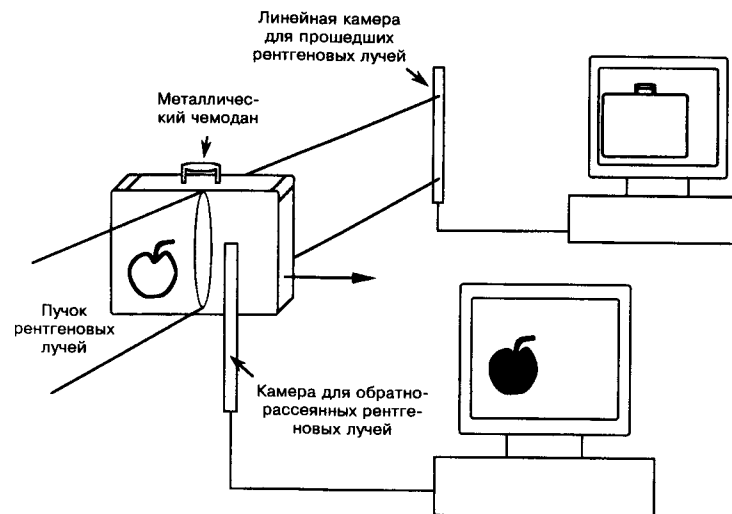


Рис. 4.40. Применение обратного рассеяния рентгеновых лучей для обнаружения биологических и других биологических материалов в контейнерах. Поглощение рентгеновых лучей биологическим материалом намного меньше, чем у металла. Поэтому трудно обнаружить биологический материал, если измерять поглощение монохроматических рентгеновых лучей. Применение обратного рассеяния рентгеновых лучей обеспечивает намного лучший контраст. Однако квантовый выход рассеяния рентгеновых лучей низок, и поэтому требуются более длительные экспозиции и более чувствительные камеры.

органические материалы, такие как мука или сахар. Обратное рассеяние рентгеновых лучей обеспечивает хороший контраст для обнаружения таких порошкообразных материалов (рис. 4.40). Основным недостатком этого метода состоит в том, что для большинства органических образцов коэффициент обратного отражения много ниже, чем коэффициент пропускания. Поэтому требуются значительно более длительные экспозиции по сравнению с пропускающей рентгеноскопией.

Добавленная литература

1. Владимиров Ю.А. (2003) Зачем нужна белковая кристаллография. Природа, № 11.
2. Лахно В.Д., Устинин М.Н. (ред.) Компьютеры и суперкомпьютеры в биологии (+CD). — Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2002. — 528 с.
3. Карташкин А. Преобразование Фурье. <http://www.n-t.ru/tp/iz/pf.htm>.
4. Колосов П.Е. Дистанционный курс «Рентгеноструктурный анализ» http://users.omskreg.ru/~kolosov/kolosov/kolosov/public_html.
5. Основы рентгеноструктурного анализа в Интернете: химический портал <http://www.chemport.ru>.
6. НИИ атомных реакторов, Отделение материаловедения и технологии. Приборы и установки для структурного анализа. <http://www.niiar.ru/omvit/rus/facilities/structures.html>.
7. Объединенный центр вычислительной биологии и биоинформатики <http://www.jcbi.ru/bio/5.shtml>.
8. Hornak J.P. Основы МРТ. Глава 5 Преобразование Фурье. <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/chap-5/chap-5-r.htm>.

ГЛАВА 5

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БЕЛКОВ

Инфракрасная спектроскопия основана на поглощении инфракрасного излучения молекулами и, если сравнивать с кристаллографией, является относительно недорогим инструментом для исчерпывающего описания молекулярных конформаций и конформационных изменений белков и других биомолекул. В зависимости от техники измерений, различают сканирующие инфракрасные (СИК) спектрометры, инфракрасные спектрометры с преобразованием Фурье (ИК-ПФ) и приборы с одной длиной волны (см. раздел 5.1). Для анализа биомолекул наиболее интересный спектральный диапазон лежит в пределах $\nu = 400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$, где волновые числа ν определяются как величины, обратные длине волны: $\nu \equiv 1/\lambda$. ИК-спектры наблюдаются только в том случае, если при возбуждении изменяется дипольный момент молекулы (рис. 5.1). У белков особенно важным для изучения вторичной структуры и структурных изменений является поглощение амидных хромофоров в области $1500\text{--}1700\text{ см}^{-1}$. Что касается разрешающей способности в установлении вторичной структуры белков, информативное содержание ИК и ИК-ПФ спектроскопии сравнимо с

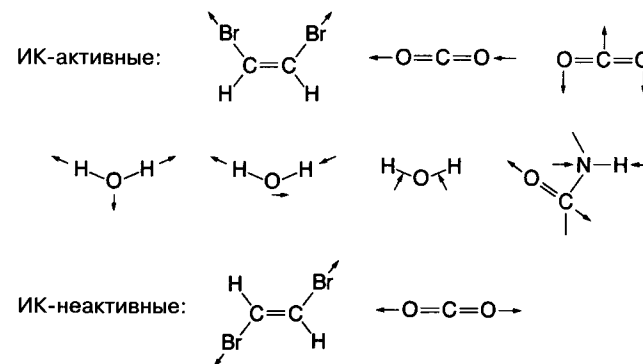


Рис. 5.1. Примеры ИК-активных и ИК-неактивных вибраций. Заметьте, что ИК-активность требует изменения дипольного момента.

таковой для кругового дихроизма (КД) (см. Nölting et al., 1997b; Nölting, 1999b), но в отношении разрешения тонкостей третичной структуры ИК и ИК-ПФ зачастую уступают КД. Однако ИК гораздо проще в исполнении особенно в масштабах быстрого времени и для дистанционного зондирования (см. СООД — LIDAR в разделе 5.1.3).

5.1. Спектрометры и приспособления

5.1.1. Сканирующие инфракрасные спектрометры

Сначала ИК-спектрометры (рис. 5.2) конструировались наподобие сканирующих УФ-поглощающих спектрофотометров. Излучение от источника, например, от теплового, работающего при 1000°C, проходит через монохроматор, который выделяет луч с одной определенной длиной волны. Монохроматический луч расщепляется на два, один из которых направляется на образец. В каждый момент времени оптический затвор (обтюратор) преграждает путь одному из этих лучей. Ин-

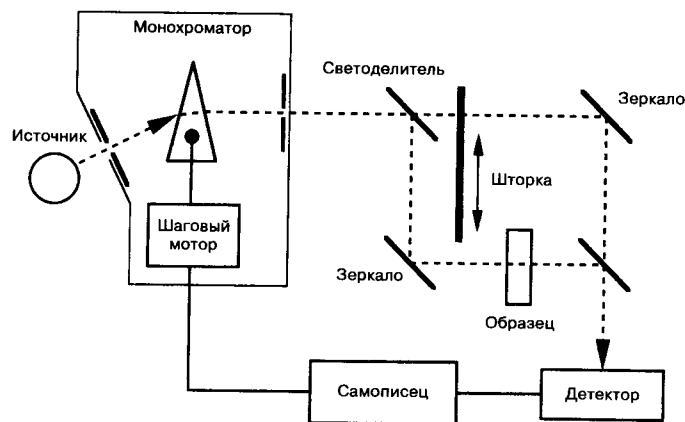


Рис. 5.2. Устройство сканирующего инфракрасного (ИК) спектрометра. Монохроматор разделяет излучение от ИК-источника на различные длины волн и выбирает одну длину волны в данный момент. Светоделитель расщепляет пучок на два луча, один из которых направляется на образец, а второй остается контрольным. Коэффициент поглощения (зависящий от химических и структурных свойств молекул образца) вычисляется на основе отношения интенсивностей обоих лучей, длины пути и концентрации образца.

тенсивности обоих лучей попеременно регистрируются ИК-детектором, например, пьезоэлектрическим, и сравниваются. Оптическая плотность образца вычисляется как логарифм отношения двух измеренных интенсивностей. Поскольку проблема фонового излучения здесь много более серьезна, чем в УФ-спектрофотометрах, то крайне необходимо применять модуляцию света. Спектр получается путем сканирования излучения в заданном диапазоне длин волн. Такой принцип сканирования до сих пор широко используется в ИК-спектрометрах с разрешением по времени в фемто- и нано-секундном масштабе, когда в качестве источника ИК-излучения используются ИК-лазеры (см. Nölting, 1999b).

5.1.2. Инфракрасные спектрометры с преобразованием Фурье

В ИК-ПФ спектрометрах (рис. 5.3—5.7) используется принцип работы интерферометра Майкельсона, который обладает тем преимуществом, что для измерения спектра одномоментно используется широкая область излучения ИК-источника. Этим они выгодно отличаются от сканирующих ИК-спектрометров, в которых, как было сказано, в каждый момент времени используется только одна длина волны, выделяемая с помощью монохроматоров. Лучшее использование излучения улучшает отношение сигнал/луч в приборе, что особенно важно при анализе сильно поглощающих образцов, для которых измерения могут быть существенно ограничены фотонным дробовым шумом. Кроме этого, спектральное разрешение, ограничиваемое длиной пути от подвижного зеркала, у ИК-ПФ-спектрометров обычно лучше, чем у сканирующих.

В ИК-ПФ-спектрометрах (рис. 5.3) пучок излучения от ИК-источника фокусируется на светоделителе, который сконструирован таким образом, что половина пучка передается на подвижное зеркало, а другая половина — на неподвижное зеркало. Оба зеркала отражают пучок обратно на светоделитель, который отражает половину обоих пучков на детектор, где они интерферируют согласно разности их фаз. Изменение интенсивности света в зависимости от разности оптических путей, называемое *интерферограммой*, является Фурье-преобразованием для спектра падающего света (интенсивности света как функции от волнового числа). Спектры поглощения получают путем измерения интерферограмм для пустой ячейки и ячейки с образцом и последующего их обратного Фурье преобразования (рис. 5.4—5.6).

На рис. 5.4 показаны три примера интерференции двух лучей монохроматического света, которые приводят к различным интенсивностям на интерферограммах. Интенсивность полос на интерферограмме,

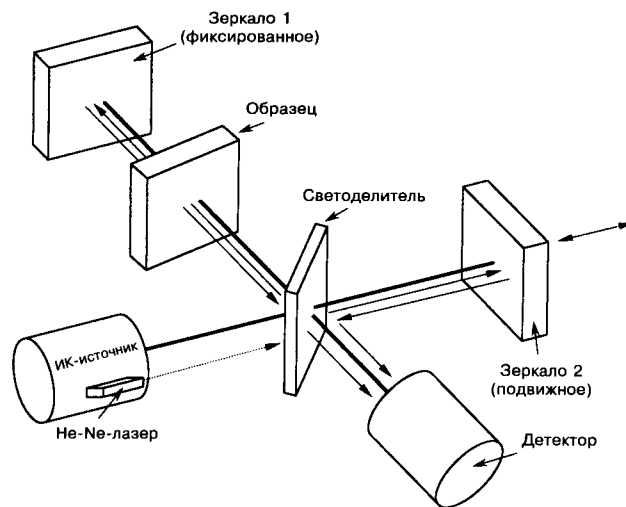


Рис. 5.3. Типовая конструкция ИК-ПФ-спектрометра. Тепловой источник (например, лампа) испускает пучок инфракрасного излучения. Интерферометр Майкельсона, состоящий из светоделителя, подвижного и неподвижного зеркал, расщепляет пучок на два луча и генерирует их интерференцию. Образец, помещенный на пути одного из лучей, изменяет интерференцию. Интерферограммы с образцом и без него регистрируются, и поглощение образца вычисляется с использованием обратного преобразования Фурье (см. рис. 5.6).

$I_{\text{интерферограмма}}(\delta)$, при интерференции в ИК-ПФ спектрометре двух полихроматических лучей с равной интенсивностью описывается уравнением 5.1:

$$I_{\text{интерферограмма}}(\delta) = \text{const} \times \int_0^{\infty} I_{\text{луч}}(\nu) \cos(2\pi\delta\nu) d\nu, \quad (5.1)$$

где δ есть разность фаз между двумя лучами, const — константа, $I_{\text{луч}}$ — интенсивность лучей и ν — волновое число. Применяя к интерферограмме обратное Фурье-преобразование, можно вычислить интенсивность лучей:

$$I_{\text{луч}}(\nu) = \text{const} \times \int_{-\infty}^{+\infty} I_{\text{интерферограмма}}(\delta) \cos(2\pi\delta\nu) d\delta. \quad (5.2)$$

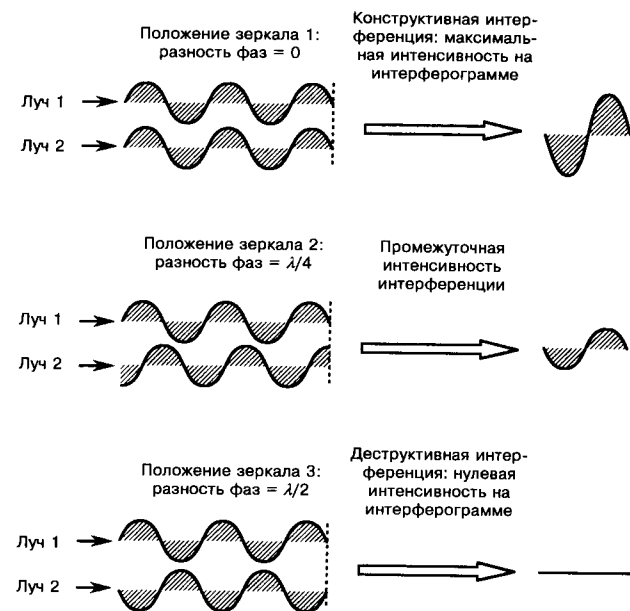


Рис. 5.4. Интерференция двух монохроматических лучей света с равными интенсивностями. *Вверху:* оба луча имеют одну и ту же фазу; их интерференция дает максимальные интенсивности на интерферограмме, т.е. обе интенсивности суммируются. *Посередине:* при разности фаз $\lambda/4$ интенсивность интерферограммы равна интенсивности интерферирующих лучей. *Внизу:* при разности фаз $\lambda/2$ оба луча гасят друг друга.

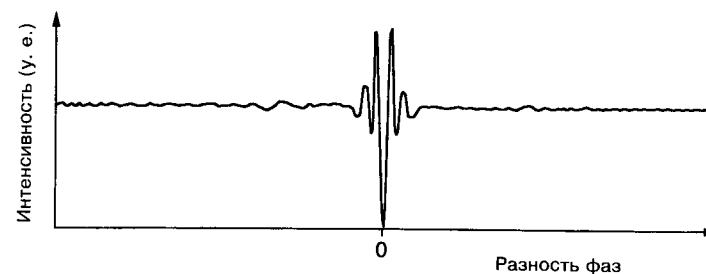


Рис. 5.5. Пример интерферограммы двух полихроматических пучков света.

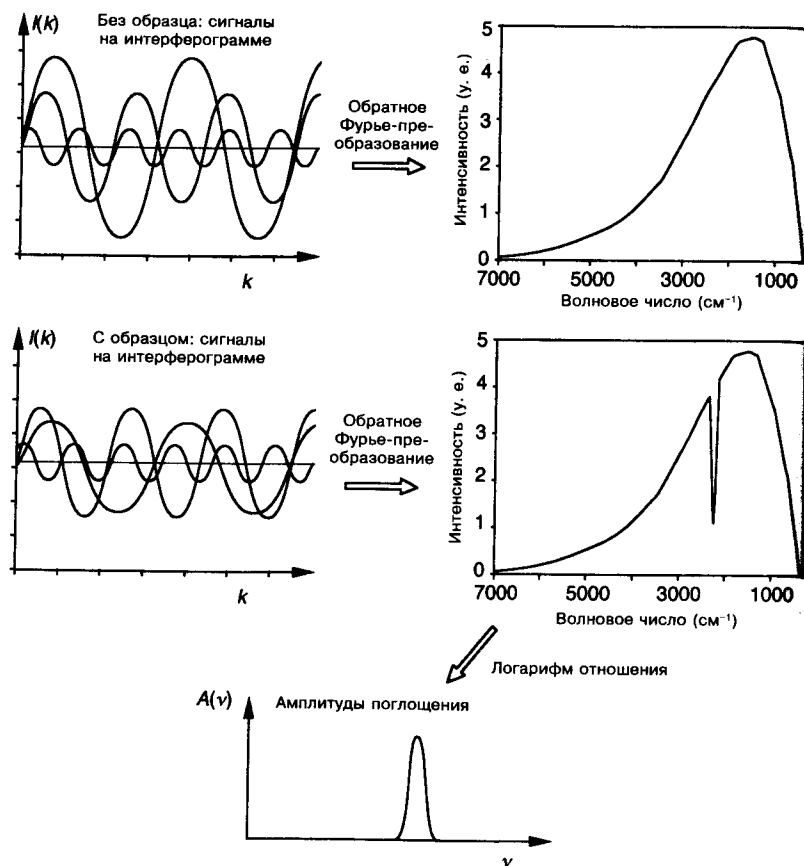


Рис. 5.6. Принцип действия ИК-ПФ-спектрометра. Интерференция ИК-излучения регистрируется детектором для кюветы, заполненной растворителем, и для кюветы, заполненной раствором образца. Обратное Фурье-преобразование двух интерферограмм дает их ИК-интенсивности. Спектр ИК-поглощения вычисляется с использованием логарифма отношения интенсивностей.

Подобным же образом из интерферограммы вычисляют интенсивность луча с образцом на его пути. Поглощение образца определяется как логарифм отношения интенсивностей без образца и с образцом.

Наиболее подходящим материалом для изготовления ячеек (кювет), держателей образцов и окошек является кварц (рис. 5.7). Полированные кварцевые пластины толщиной 0,5–1 мм достаточно прозрачны в области 400–4000 см^{-1} (длины волн 25–2,5 мкм) (Jiang et al.,

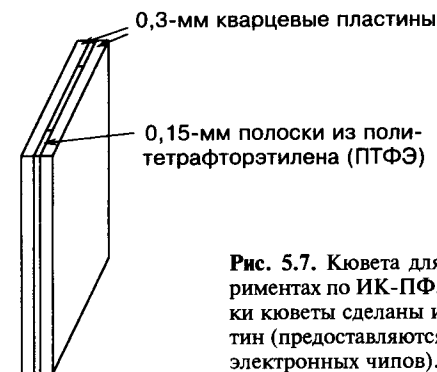


Рис. 5.7. Кювета для образца в экспериментах по ИК-ПФ. Прозрачные стенки кюветы сделаны из кварцевых пластин (предоставляются производителями электронных чипов).

1996). Только хрупкость этого материала и его высокий показатель преломления могут создавать проблемы при использовании в некоторых экспериментальных установках. Обычно используемые источники инфракрасного излучения работают при 1000°C. Светоделители получают путем напыления тонкой пленки германия на слайды их бромида калия (KBr) или иодида цезия (CsI); они прозрачны, соответственно, вплоть до 400 см^{-1} (длина волн 25 мкм) и 200 см^{-1} (длина волн 50 мкм). Материалом для пьезоэлектрических детекторов наиболее часто служат теллурид ртути-кадмия (ТРК) или дейтерированный сульфат триглицина (ДСТГ). Для их охлаждения используют жидкий азот. Блестящее введение в инструментарий спектроскопии ИК-ПФ можно найти у Perkins (1986).

5.1.3. Лидар, оптическая когерентная томография, attenuированное полное отражение и ИК-микроскопы

ИК-спектроскопия наилучшим образом подходит для дистанционного зондирования облаков (выбросов) биологических агентов (рис. 5.8). ИК-установка для светового обнаружения и оценки дальности (лидар) состоит из импульсного ИК-лазера и ИК-детектора, которые измеряют обратно рассеянный свет от лазера. Так как свет движется исключительно быстро, детекторы должны успевать измерить отраженное эхо до того, как будет послан следующий импульс. Время, за которое лазерный импульс достигает цели и возвращается обратно, является мерой расстояния. Передвижные коммерческие лидар-системы довольно часто используются в интегральных системах ориентирования в пространстве (СОП) для нахождения собственных координат.

Оборудованная, скажем, оптическим модулятором, который быстро изменяет направление луча, и установленная на крышу дома уста-

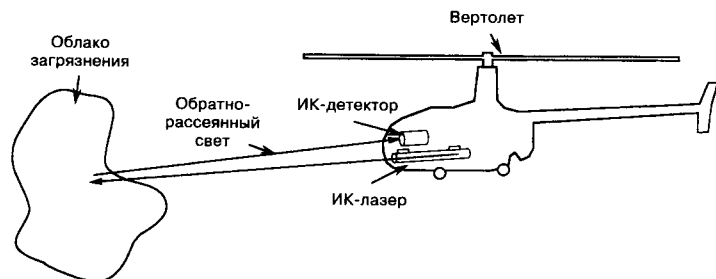


Рис. 5.8. Дистанционное зондирование изменений окружающей среды (например, биологического материала) путем измерения обратного рассеяния света с помощью ИК-установки для светового обнаружения и оценки дальности (СООД).

новка ИК-лидар может сканировать округу в радиусе до 10 км. Этот метод важен, например, для систем раннего оповещения о смоге в больших городах или для трехмерного анализа структуры лесных массивов других территорий (рис. 5.9). Дистанционное зондирование изменений в структуре леса использует информацию о длительности и интенсивности многократных отражений от листьев и ветвей. Воздействие загрязнителей окружающей среды и вредителей сельского хозяйства определяются быстро и на больших пространствах, что в результате позволяет существенно снизить экономические убытки.

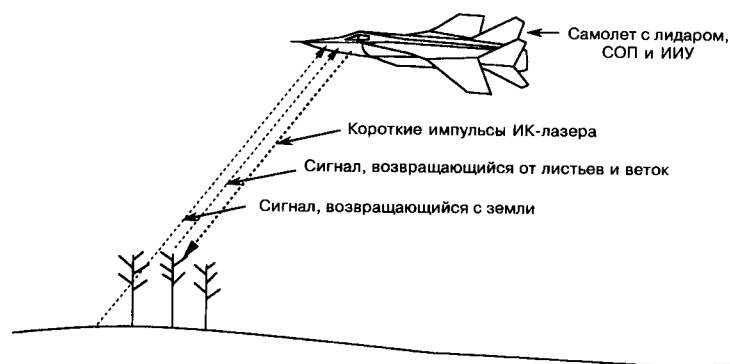


Рис. 5.9. Дистанционное обследование структуры леса и местности с помощью технологии ИК-лидар. Самолет оборудован системой ориентирования в пространстве (СОП) и инерционным измерительным устройством (ИИУ). ИИУ содержит несколько гироскопов и измеритель ускорения (акселерометр). В случае выхода СОП из строя с помощью ИИУ можно достаточно точно определять положение и угол наклона.

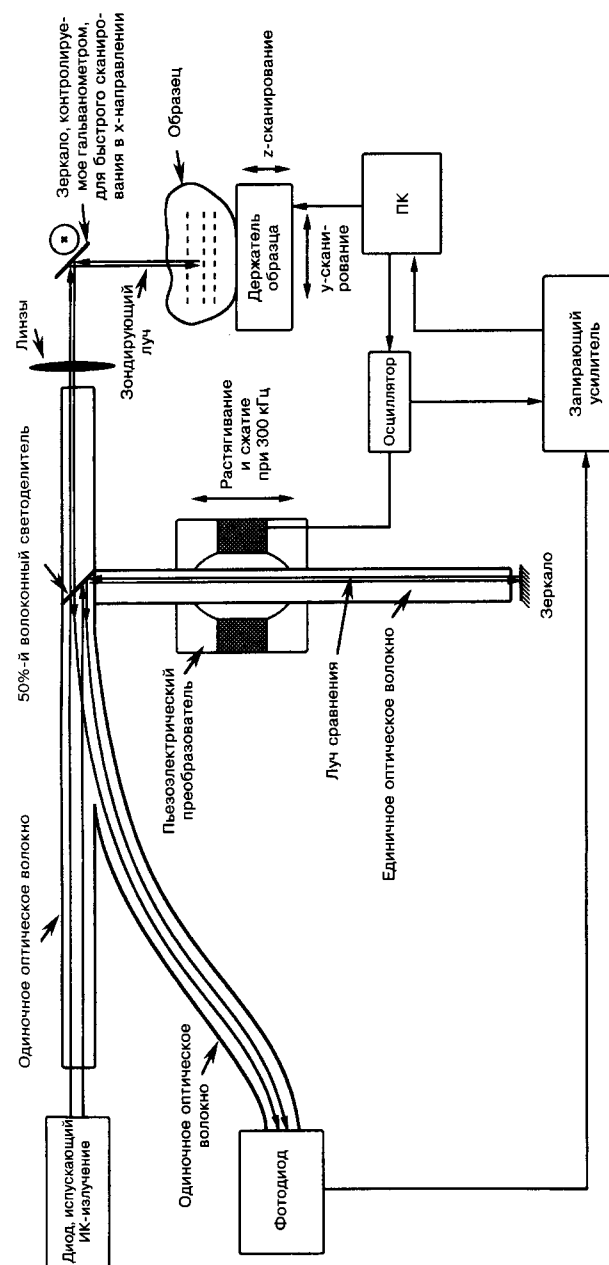


Рис. 5.10. Оптическая когерентная томография (ОКТ). Пучок ИК-излучения от диодного источника расщепляется на два луча — контрольный и опытный. Луч, отраженный от образца, интерферирует с контрольным лучом, и их интерференция регистрируется фотодиодом. Длина пути контрольного луча модулируется натяжением оптического волокна с пьезоэлектрическим преобразователем. Когда оба луча проходят одинаковое расстояние, они интерферируют конструктивно. Сигнал от контрольного луча вычитается из общей интерференционной интенсивности с помощью запирающего усилителя (Duncan et al., 1998).

Другим важным вариантом ИК-спектроскопии биологических образцов является оптическая когерентная томография (ОКТ) (рис. 5.10 и 5.11). В ней измеряется эхо инфракрасных лучей, обратно рассеянных от внутренних микроструктур внутри биологических объектов, что позволяет получать их изображения в масштабе до нескольких микрон. В конструкции на рис. 5.10 ИК-излучение, обратно рассеянное от образца, интерферирует с контрольным лучом. Свет от рассеивающего слоя, который находится на определенной глубине внутри образца, имеет ту же фазу, что и контрольный луч, и поэтому они интерферируют конструктивно, т. е. производят интерференцию с высокой интенсивностью. Свет от слегка более глубокого или менее глубокого рассеивающего уровня вызывает более низкую интенсивность интерференции. Сигналы, поступающие от уровней с различной глубиной, выделяют из общей интенсивности интерференции с помощью модуляции фаз контрольного луча и измерения интенсивности с запирающим усилителем (Duncab et al., 1998). На рис. 5.11 изображен второй вариант конструкции оптической когерентной томографии (Andretzky et al., 1998; Häusler, Lindner, 1998).

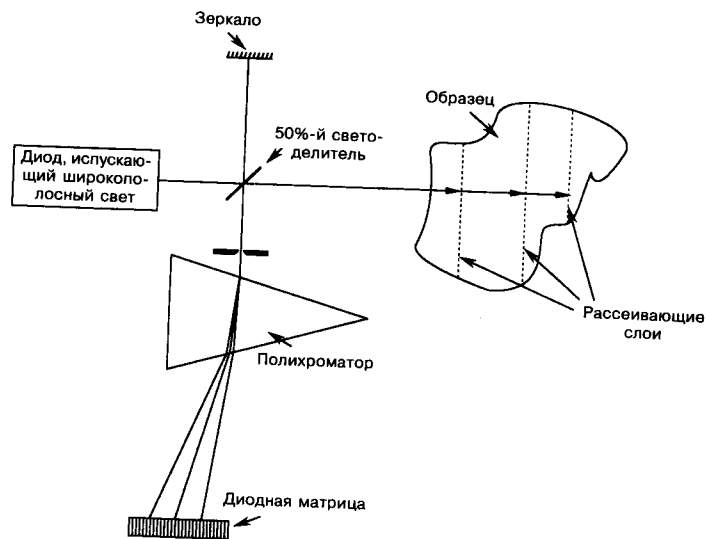


Рис. 5.11. Спектральная оптическая когерентная томография (СОКТ) (Andretzky et al., 1998; Häusler, Lindner, 1998). Полихроматический луч, отраженный от слоев образца на различной глубине, интерферирует с полихроматическим контрольным лучом. Интерференция лучей анализируется с помощью полихроматора и многоканального детектора. Из наблюдаемых изменений спектра, возникающих вследствие интерференции, получают информацию о глубине рассеивающих слоев.

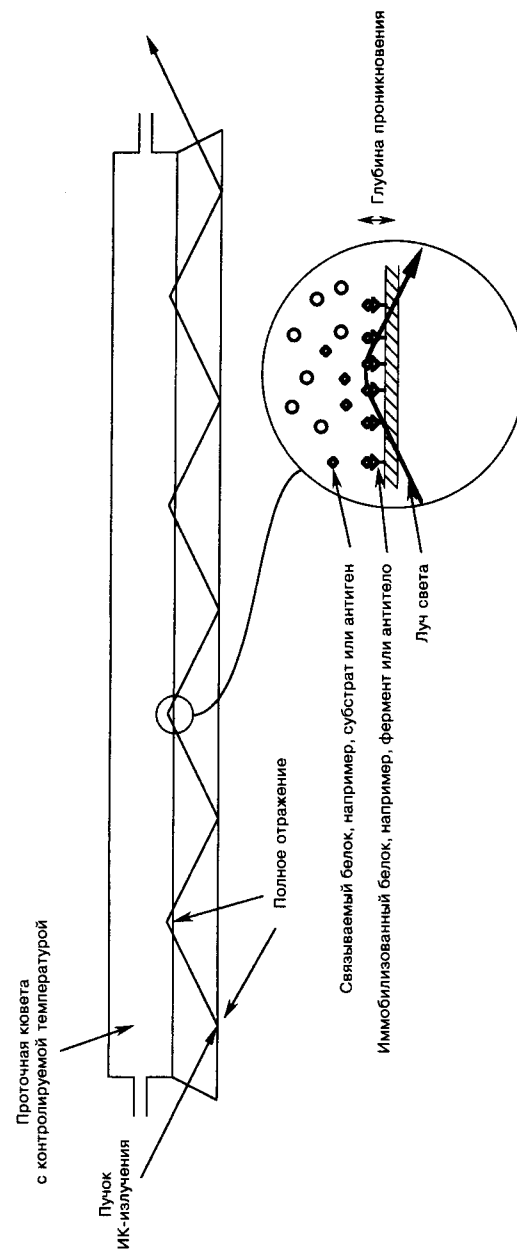


Рис. 5.12. Проточная кювета для инфракрасной спектроскопии с аттенуированным общим отражением (АОО) (Fingeli et al., 1998; Feigheleman et al., 2002; Snabe, Petersen, 2002). Незначительная часть внутреннего полностью отраженного света выходит за пределы волновода и таким образом может зондировать молекулы образца на его наружной стороне. Часть световой волны, которая покидает волновод в точках полного отражения, называется *исчезающей* волной. С помощью многократных отражений можно достичь усиления измеряемого сигнала более чем в 100 раз, и поэтому для анализа достаточно иметь очень малое количество образца.

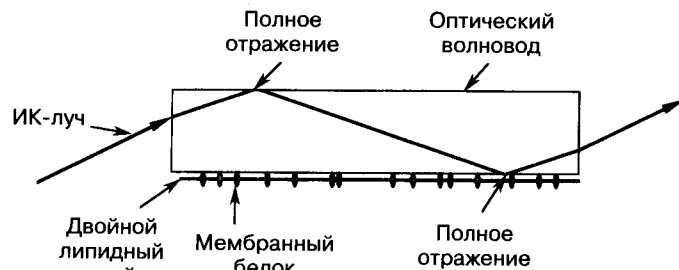


Рис. 5.13. Применение инфракрасной спектроскопии с аттенуированным полным отражением (АОО) для анализа мембранных белков (см. Ding et al., 2002).

et al., 1998; Häusler, Lindner, 1998). Здесь информация о глубине получается из анализа спектра обратного рассеяния света.

Еще одной техникой ИК-спектроскопии, о которой следует упомянуть, является аттенуированное полное отражение (АПО) (рис. 5.12 и рис. 5.13; см. Ding et al., 2002; Feughelman et al., 2002; Fringeli et al., 1998; Snabe, Petersen, 2002). Здесь регистрируются изменения коэффициента внутреннего полного отражения ИК-луча от тонкого слоя образца, осажденного на поверхности волновода. Преимуществом АПО

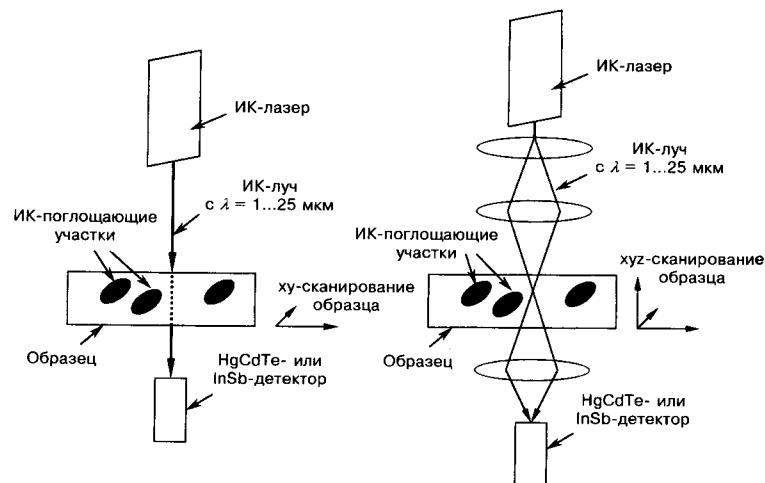


Рис. 5.14. Сканирующий ИК-микроскоп. Сфокусированный пучок излучения ИК-лазера проходит сквозь образец и регистрируется. Слева: простой микроскоп с плоскостным разрешением, особо удобен для анализа тонких слоев образца. Справа: микроскоп с трехмерным (3D) разрешением: для получения изображения образца передвигается в трех ортогональных направлениях вдоль осей x , y и z .

на тонких слоях образцов является значительное увеличение длины эффективного пути и повышение чувствительности вследствие многократных отражений, по сравнению с обычной пропускающей спектроскопией таких образцов.

Вследствие значительно более низкого рассеяния ИК-излучения по сравнению с более коротковолновым излучением ИК-микроскопы (рис. 5.14) дают возможность анализировать наиболее сильно рассеивающие образцы. Компьютеризованное процессирование изображений позволяет получать двух- и трехмерное разрешение. В более сложных конструкциях микроскопов могут использоваться пошагово сканирующие интерферометры для глубинного фотоакустического профилирования, монохроматоры для спектрального анализа, а также поляриметры и анализаторы линейного дихроизма (ЛД).

5.2. Практические применения

Одним из основных биофизических применений ИК-ПФ является определение структуры и конформационных изменений белков (Barrera et al., 2002; Butler et al., 2002; Castellanos et al., 2002; Dong et al., 2002; Hilario et al., 2002; Moritz et al., 2002; Mui et al., 2002; Noinville et al., 2002), пептидов (Bianco et al., 2002; Gordon et al., 2002; Huang et al., 2002; Tores et al., 2002) и ДНК (Lindqvist, Graslund, 2001; Malins et al., 2002). В некоторых случаях удается выявить взаимодействия на уровне отдельных аминокислотных остатков (Kandori et al., 2002; Mezzetti et al., 2002; Zhang et al., 2002a).

ИК-ПФ с изотопным мечением особенно полезен для структурного анализа специфических районов макромолекул (рис. 5.15). Например, в опытах по изотопному обмену на основании 50 000 колебаний белка в комплексе АТФ-азы с фосфатом кальция трифосфатного остатка были выявлены три растягивающих колебания фосфатной группы (Barth, 2002).

Времяразрешающая пошагово-сканирующая ИК-ПФ-спектроскопия позволяет отслеживать конформационные изменения белков в микросекундном масштабе времени (Bailey et al., 2002).

ИК-ПФ-спектроскопия позволила картировать нуклеотид-связывающий сайт кальциевой АТФ-азы (Liu, Barth, 2002). ИК- и ИК-ПФ-спектроскопия суть два из немногих методов, пригодных для отслеживания конформационных изменений в белках при высоком давлении (рис. 5.16; Dzwolak et al., 2002). ИК-ПФ-спектроскопия бактериородопсина выявила его конформационный переход в предрасплавленное состояние при 80°C (Heyes et al., 2002). ИК-ПФ пригоден также для исследования структуры гидратационной оболочки белковых молекул в органических растворителях (рис. 5.17; Costantino et al., 1995). Более того, оба вида ИК-спектроскопии были использованы для изучения свойств облученного крахмала (Kizil et al., 2002) и для определения диэдрических углов в трипептидах (Schweitzer-Stenner, 2002). С по-

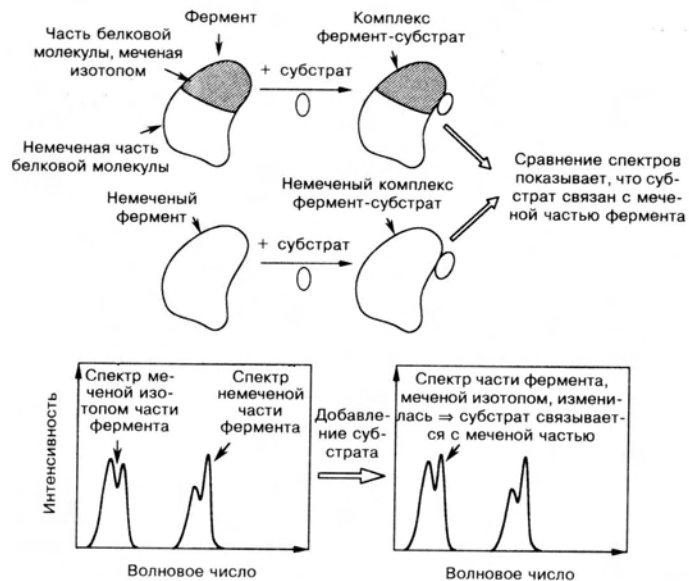


Рис. 5.15. ИК-ПФ-спектроскопия с изотопным мечением (см. Barth, 2002; Li et al., 2002). Поскольку спектр той части белковой молекулы, которая помечена изотопом, получается существенно смещенным, его можно отличить от спектра немеченой части. Изменение ИК-спектра белка при присоединении субстрата показывает, к какой части молекулы он присоединен. В данном примере высота пика в спектре меченой изотопом части белка изменилась при связывании с субстратом. Это показывает, что субстрат связывается с этой меченой частью фермента.

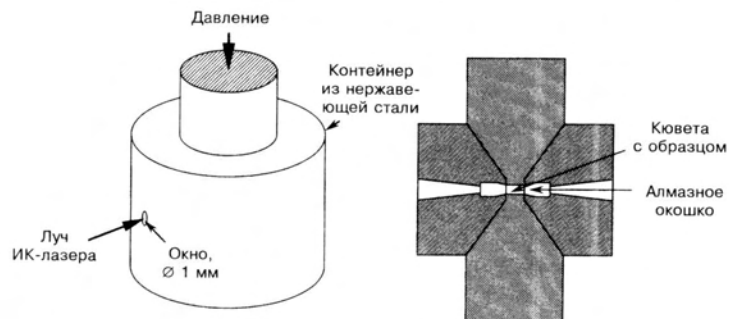


Рис. 5.16. Аппарат для отслеживания сворачивания белка под высоким давлением с помощью ИК. Поскольку объем несвернутого белка меньше, чем свернутого, высокое давление способствует переходу в несвернутое состояние.



Рис. 5.17. Молекула белка в органическом растворителе: только немногие особо сильно связанные молекулы воды остаются присоединенными к молекуле белка.

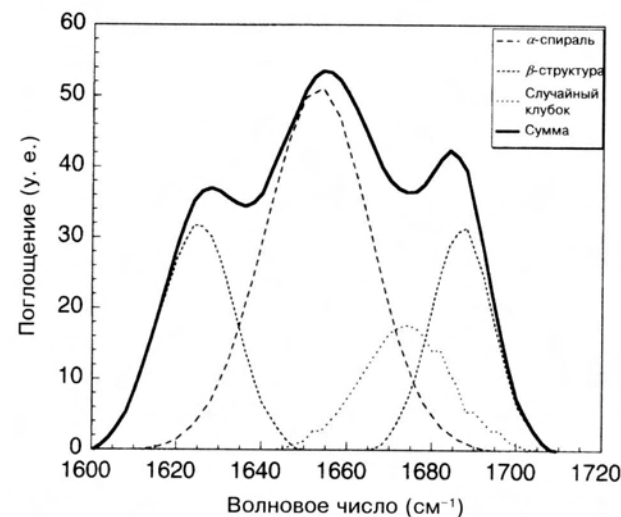


Рис. 5.18. Разложение спектра ИК-ПФ на три компонента, соответствующие α-спиралям, β-структурам и нерегулярным структурам. Процентное содержание структур и структурные изменения, например, вследствие денатурации белка, поддаются количественной оценке.

мощью ИК-спектроскопии можно обнаружить также молекулярные изменения в доклинических образцах скрепи (Kneipp et al., 2002). ИК-ПФ-спектроскопия может служить в качестве оптического носа для предсказания запахов (van Kempen et al., 2002) и для химического анализа напитков (Coimbra et al., 2002); Duarte et al., 2002).

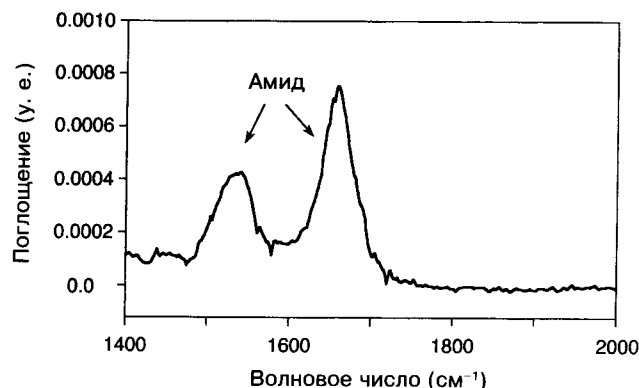


Рис. 5.19. ИК-ПФ-спектр мономолекулярного слоя миоглобина спермы кита (A126C) (Jiang et al., 1996). Пики в районе 1660 см⁻¹ и 1530 см⁻¹ соответствуют амидным полосам I и II. Спектр получен с помощью ИК-ПФ-спектрофотометра, снабженного триглицинсульфатным (ТГС) детектором (BioRad).

ИК-ПФ-микроскопия определяет отдельные клетки при пространственном разрешении около 18 мкм (Lasch et al., 2002). ИК-спектроскопия является также инструментом для различения различных штаммов или типов клеток (Gaigneaux et al., 2002).

На рис. 5.18 показан пример разложения ИК-ПФ-спектра белка на компоненты, соответствующие α -спиральным, β -складчатым и нерегулярным (типа случайного клубка) структурам. Подобные разложения можно получить расчетным путем, представив весь измеренный спектр, например, как линейную комбинацию компонентов для вторичных структур.

Рис. 5.19 иллюстрирует поразительную чувствительность ИК-ПФ-спектроскопии. Образцом был двойной молекулярный слой белка. Поскольку при очень низком поглощении образца довольно трудно избежать резких пиков поглощения парами воды, эти измерения были проведены в камере, заполненной азотом, при двух различных очень низких концентрациях воды, спектры которой затем были вычтены. С помощью такой процедуры средний уровень шума и артефактов был снижен до величины, не превышающей 0,00003 единицы поглощения.

Добавленная литература

1. Отто М. Методы аналитической химии (в 2-х томах). — М.: Техносфера, 2004. — 800 с.
2. НПП Лазерные системы. Лидар: <http://www.lsystems.ru/photo/?group=1837>.
3. Институт молекулярной физики. Государственный научный центр ТРИНИТИ. Многоволновой NH₃-лидар для анализа газовых загрязнений в атмосфере: <http://www.tpmi.ru/Project/Ecology/ec-1.pdf>.

ГЛАВА 6

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

6.1. Просвечивающий электронный микроскоп

Просвечивающая электронная микроскопия использует волновые свойства движущихся электронов с целью получать изображения изучаемого объекта с высоким разрешением.

6.1.1. Принцип действия

В 1986 г. Нобелевская премия по физике была поделена между тремя исследователями: половину получил Эрнст Руска (Ernst Ruska) за фундаментальные работы по электронной оптике и за создание первого электронного микроскопа (ЭМ), а вторую половину получили Герд Биннинг (Gerd Binnig) и Генрих Ройпер (Heinrich Rohrer) за создание

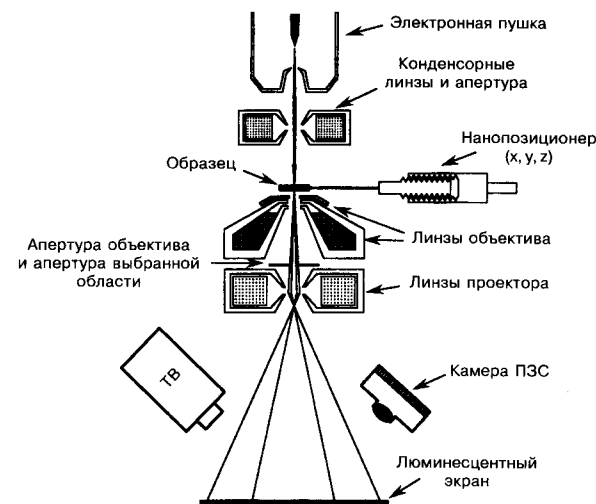


Рис. 6.1. Просвечивающий электронный микроскоп.

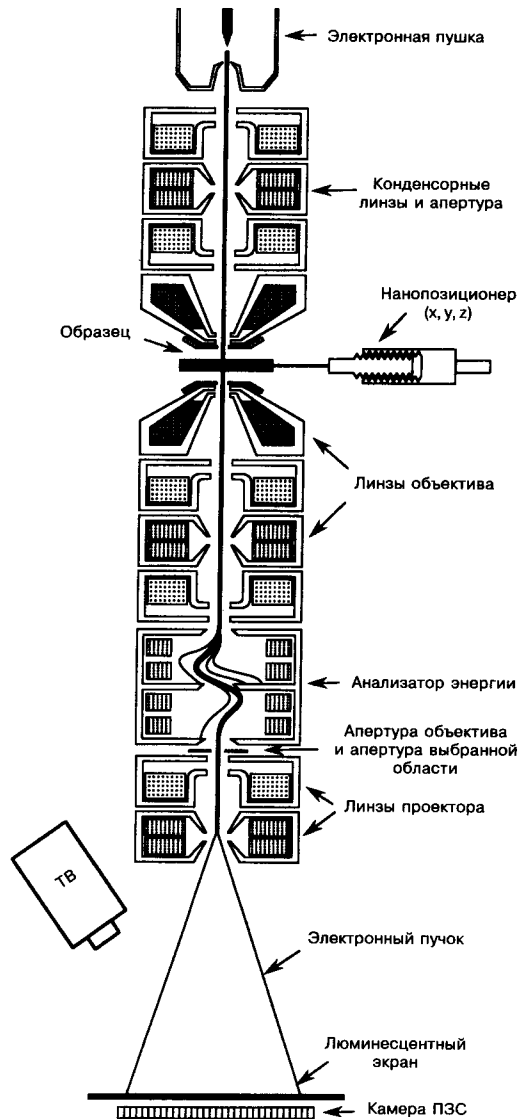


Рис. 6.2. Более сложная конструкция просвечивающего электронного микроскопа с анализатором, который способен удалять неупруго рассеянные электроны (см. LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Германия).

сканирующего туннельного микроскопа (см. гл. 7). В некотором смысле принцип работы просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) напоминает работу диапроектора (проектора слайдов) (рис. 6.1 и 6.2). Электроны, вылетающие из электронной пушки, проходят через конденсорные линзы, которые фокусируют электроны на объекте. Пучок электронов проходит сквозь образец. Линзы объектива и линзы проектора увеличивают прошедший луч и проецируют его на люминесцентный экран. Удары электронов возбуждают экран и создают видимое увеличенное изображение образца. Изображение регистрируется различными детекторами, такими, например, как камера прибора с зарядовой связью (ПЗС).

6.1.2. Разрешение

Электронные микроскопы имеют значительно большее увеличение и большую фокусную глубину, чем обычные оптические микроскопы. Пространственное разрешение ПЭМ достигает 0,1 нм (1 Å) при ускоряющем напряжении 50–600 кВ. Вследствие волновой природы электронов предел разрешения d , определяемый теорией дифракции для когерентных изображений, составляет:

$$d = \frac{\lambda}{n \sin(\alpha)}, \quad (6.1)$$

где λ , n и α суть, соответственно, длина волны в вакууме, коэффициент преломления в среде (который в ПЭМ равен 1) и апертурный полуугол объектива (рис. 6.3). Согласно отношению де Бройля, длина волны λ для электронов составляет:

$$\lambda = \frac{h}{mv}, \quad (6.2)$$

где $h = 6,6261 \times 10^{-34}$ Дж·с, m и v суть, соответственно, постоянная Планка, масса электрона и скорость электрона. При релятивистски высоких скоростях пучка электронов мы должны использовать уравнения Эйнштейна:

$$m = \frac{m_0}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}}, \quad E = mc^2, \quad (6.3)$$

и получаем:

$$\lambda = \frac{hc}{\sqrt{2E_0\Delta E + (\Delta E)^2}} = \frac{hce^{-1}}{\sqrt{2m_0c^2e^{-1}V + V^2}} = \frac{1,24 \text{ нм кВ}}{\sqrt{(1022 \text{ кВ}) \cdot V + V^2}}, \quad (6.4)$$

Здесь $e = 1,6022 \times 10^{-19}$ Кл — элементарный заряд, $m_e = 9,1094 \times 10^{-31}$ кг — масса покоя электрона, $c = 2,99792 \times 10^8$ м/с — скорость света в ваку-

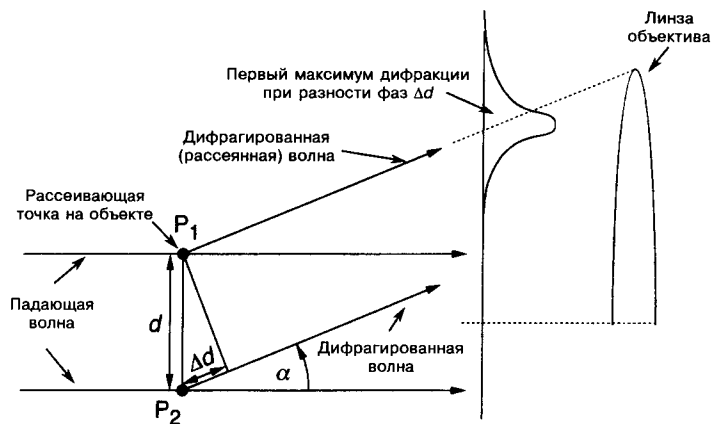


Рис. 6.3. Для того, чтобы различить две точки P_1 и P_2 на объекте, линза объектива должны уловить первый дифракционный максимум этих двух точек. Он появляется в том месте, где волны, дифрагированные (рассеянные) от этих двух точек, имеют разность фаз Δd для данной длины волны. Уравнение 6.1 выведено для таких условий. Типичный объектив имеет выходное отверстие диаметром около 2 мм и фокусное расстояние около 1–2 мм.

уме, $E = E_0 + \Delta E$ — кинетическая энергия электронов, где $E_0 = m_e c^2$ и $\Delta E = V \cdot e$, и V — приложенное ускоряющее напряжение, обычно в пределах от 200 В до 200 кВ. Например, для напряжения в 100 кВ мы находим $\lambda = 0,0037$ нм. В противоположность световым микроскопам линзы ПЭМ имеют малые апертуры объектива, обычно $\alpha = 1-2^\circ$, и поэтому для данного примера, согласно уравнению 6.1, пределы пространственного разрешения составляют 0,1–0,2 нм.

6.1.3. Источники электронов

Обычными источниками электронов являются термоионные электронные пушки (рис. 6.4) или пушки автоэлектронной эмиссии (рис. 6.5). Большое значение имеют яркость и размер источника электронов. Рис. 6.6 иллюстрирует, почему это важно. Для пучка света, проходящего сквозь оптическую систему, произведение площади на пространственный апертурный угол остается величиной постоянной. Таким образом, используя лишь большой апертурный угол оптической системы, крупный источник можно сфокусировать в небольшое пятнышко. Но поскольку апертурные углы у электронных линз ограничены, то для того, чтобы получить яркое изображение образца, требуются источники малого размера и высокой яркости.

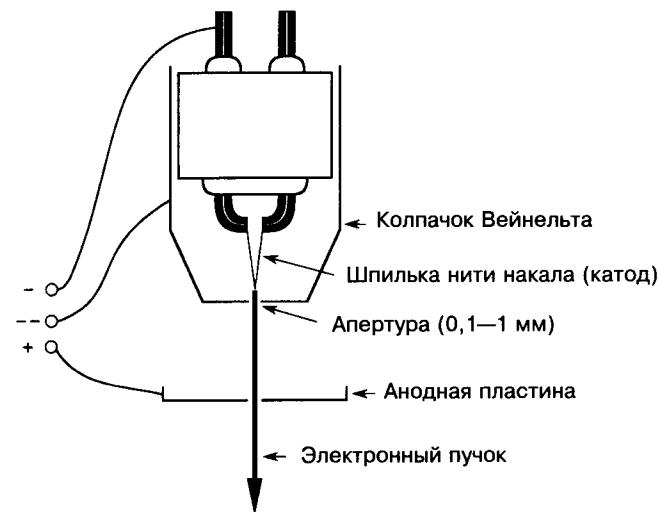


Рис. 6.4. Термоионная электронная пушка (см. Structure Probe, Inc., West Chester, PA).

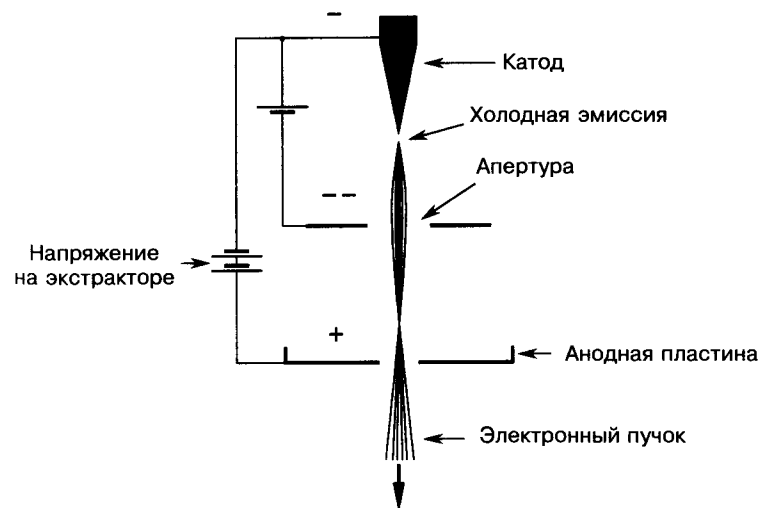


Рис. 6.5. Пушка холодной эмиссии, способная фокусировать пучок электронов с помощью электростатических линз, состоит из двух апертур с различными электростатическими потенциалами.

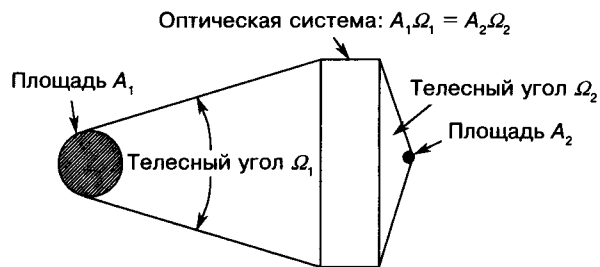


Рис. 6.6. При создании изображения объекта с помощью оптической системы произведение площади A и телесного угла апертуры Ω остается примерно постоянным.

6.1.4. Сетчатые подложки

Сетчатые подложки для ПЭМ (рис. 6.7) не должны электризоваться, иначе это может исказить траекторию электрона. Обычно они изготовляются из проводящих химически инертных и не испаряющихся в вакууме материалов, таких как, например, платина или платино-иридиевые сплавы.

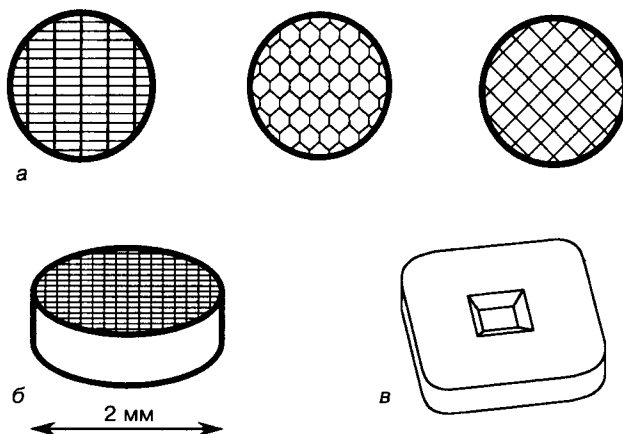


Рис. 6.7. Подложки для ПЭМ:

$a, б$ — наиболее распространенные рисунки сеток. Они изготавливаются из различных материалов, например из платины, серебра, вольфрама, молибдена, нержавеющей стали или титана. Их них платина является химически наиболее инертной, но и более дорогой. $а$ — подложка из нитрида кремния с единственным окошком (от SPI Supplies West Chester, PA).

6.1.5. Электронные линзы

Существуют линзы магнитные (рис. 6.8 и 6.9), электростатические (рис. 6.5) и линзы смешанного типа (рис. 6.10 и 6.11). Некоторые характеристики, такие как фокусная длина, сферическая aberrация и хроматическая aberrация, практически одинаковы у электронных и оптических линз. Но одним из важнейших различий является взаимодействие зарядов между электронами в пучке. Вот почему электронная оптика обычно конструируется таким образом, чтобы пути лучей практически не скрещивались.

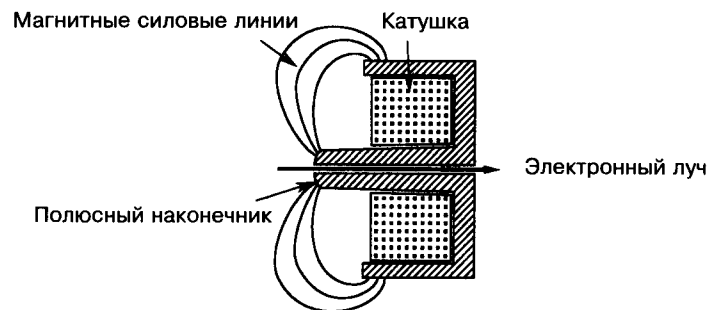


Рис. 6.8. Линза Эрнста Руски на основе полюсного наконечника. Магнитная катушка создает прецизионное круговое магнитное поле и работает как линза, собирая пучок электронов в тонкий луч.

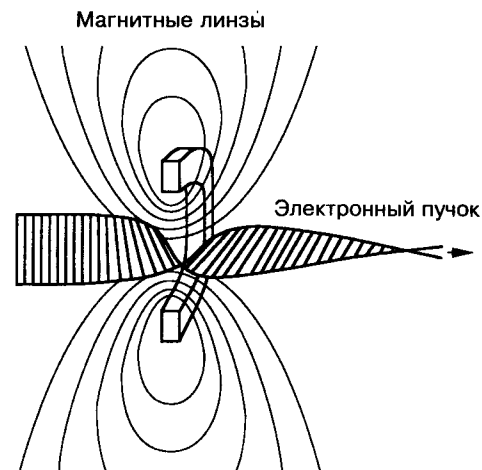


Рис. 6.9. Действие магнитных электронных линз на основе полюсных наконечников. Одним из важнейших достижений Эрнста Руски была разработка электронных линз.

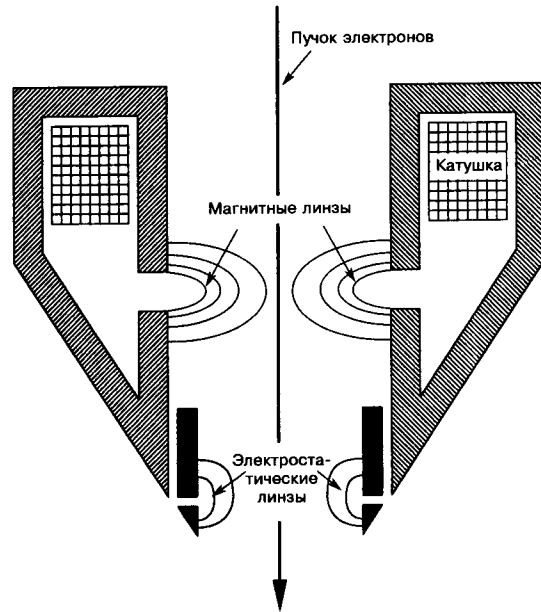


Рис. 6.10. Электронные линзы комбинированного типа. Магнитное поле заставляет электроны двигаться по спиральным траекториям, а электрическое поле затем уменьшает диаметр электронного пучка. Для коррекции сферической aberrации могут использоваться дополнительные катушки (не показаны).

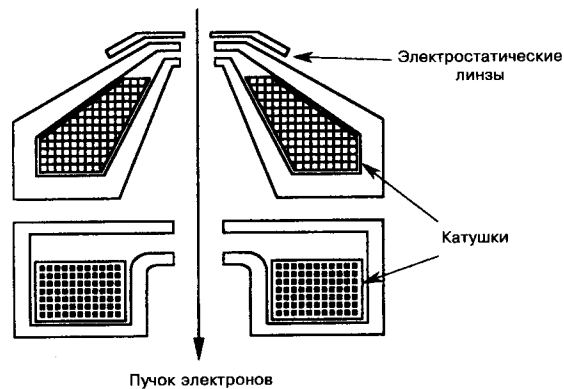


Рис. 6.11. Комбинированные линзы состоят из магнитных и электростатических линз.

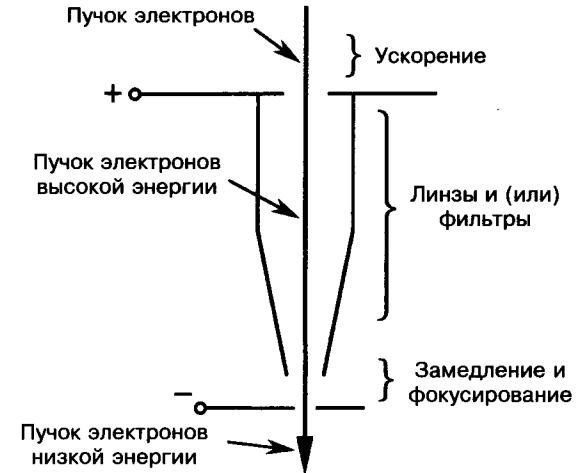


Рис. 6.12. Ускоритель пучка (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Германия). Электроны ускоряются до высоких энергий, проходят сквозь конденсорные линзы и фильтры, но перед тем, как провзаимодействовать с образцом, замедляются. Такая техника защищает электронный луч от возмущения (рассеяния) магнитными полями в колонне микроскопа.

Для этого в ускорителе (рис. 6.12) создается пучок с высокой энергией, который проходит сквозь конденсорную колонну микроскопа, но затем замедляется и проходит сквозь образец. Электроны с высокой энергией менее подвержены рассеивающему влиянию магнитных и электрических полей. При этом распространение электронов в колонне не зависит от энергии отобранных зондирующих электронов.

6.1.6. Взаимодействие электронов с образцом и электронная микроскопия

Хроматическая aberrация возникает по двум основным причинам:

- 1) электроны изменяют свою энергию вследствие неупругого рассеяния (рис. 6.13);
- 2) электроны, испускаемые источником, обладают слегка различными энергиями.

Дисперсия энергии электронов измеряется с помощью энергетических фильтров (рис. 6.14). Подобные рассеивающие элементы отбирают монохроматические электроны и тем самым снижают хроматическую aberrацию (рис. 6.14 и 6.15).

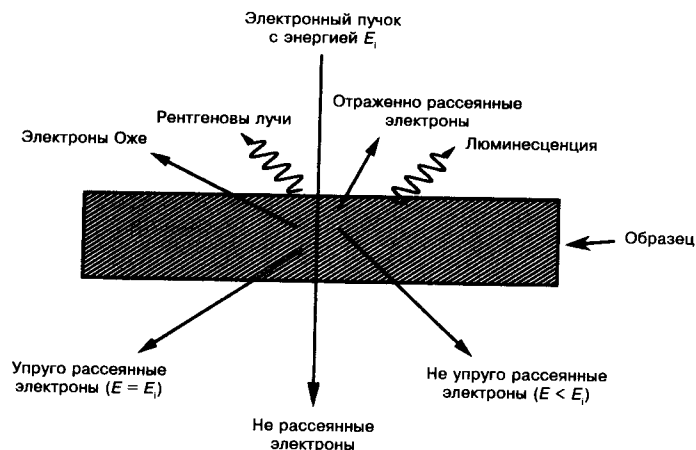


Рис. 6.13. Взаимодействие электронного луча с образцом. Неупруго рассеянные электроны изменяют как свое направление, так и энергию, и могут порождать диффузное слабоконтрастное фоновое изображение до тех пор, пока эти электроны не элиминированы энергетическими фильтрами (см. рис. 6.15). Упруго рассеянные электроны интерферируют как друг с другом, так и с нерассеянными электронами, и создают фазовоконтрастное изображение.

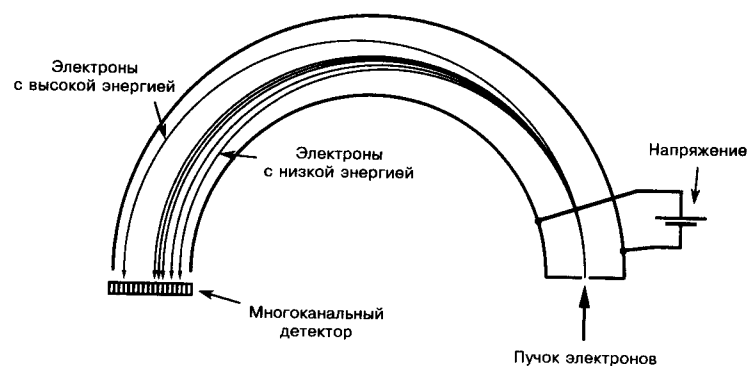


Рис. 6.14. Определение энергии электронов. Напряжение, создаваемое между двумя полусферическими электродами, рассеивает электроны в соответствии с их скоростью. Чтобы зарегистрировать весь энергетический спектр электронов, производится развертка напряжения.

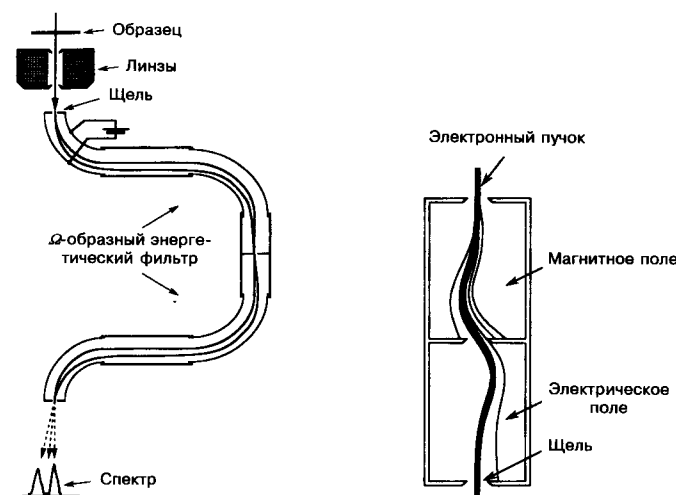


Рис. 6.15. Два типа энергетических фильтров электронных пучков для усиления контраста или для химического анализа образца. Слева: Ω -фильтр. Справа: фильтр, использующий магнитное или электрическое поля. Удаление из электронного пучка неупруго рассеянных электронов ослабляет диффузный фон и тем самым усиливает контраст.

Разность фаз, возникающая вследствие различий в длинах оптического пути и рассеяния электронов, влияет на контрастность (рис. 6.16). Часто бывает довольно трудно достичь необходимую контрастность образца при одновременно высоком разрешении изображения. Обычным методом визуализации очень малых биологических объектов, таких как белковые молекулы, является негативное контрастирование.

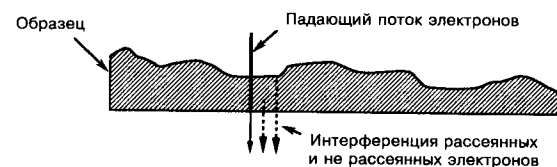


Рис. 6.16. Создание амплитудного контраста. В разных точках электронный пучок ослабляется в различной степени вследствие рассеяния и интерференции. Упруго рассеянные электроны, т. е. те, у которых изменено направление движения, но не энергия, интерферируют друг с другом и с нерассеянными электронами, что приводит к получению фазовоконтрастного изображения.

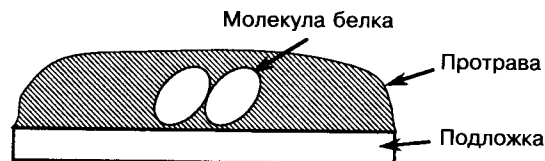


Рис. 6.17. Вид сбоку негативно протравленного образца. ПЭМ распознает объемы с более низкой плотностью.

вание. Важным нововведением для улучшения контрастирования явилось изобретение усовершенствованной техники с улучшенным разрешением (Haider et al., 1998) и нанопроизводство твердотельных линз Френеля для электронной оптики (Ito et al., 1998).

Для биологических образцов важным фактором, ограничивающим разрешающую способность ПЭМ, являются радиационные повреждения, т. е. разрушение образца неупруго рассеянными электронами. Поскольку для получения изображения нужно определенное количество электронов, это ограничение зависит от соотношения числа упруго и неупруго рассеянных электронов. По этой причине на практике разрешение белковых молекул при низких температурах не бывает лучше 5 Å. Негативное контрастирование (рис. 6.17) может обеспечить некоторое улучшение, но атомного разрешения для белковых молекул все равно достичь невозможно. Недавно была высказана теоретическая возможность нейтронного микроскопа, для которого отношение числа упруго и неупруго рассеянных частиц может быть улучшено при исследовании белков, меченных изотопами (Henderson, 1996). Другой теоретической возможностью преодолеть проблему разрушения структуры образца в процессе измерения может оказаться применение сверхкоротких импульсных вспышек электронов для глубоко замороженных образцов. Если продолжительность вспышки будет короче, чем время механических движений белковой молекулы, то их химическая деструкция будет в меньшей степени влиять на получаемую микрографию.

6.1.7. Примеры биофизических применений

Рис. 6.18 демонстрирует разрешающую способность ПЭМ при изучении больших белковых комплексов (Ranson et al., 1998; Roseman et al., 1996; Rye et al., 1999; Saibil, 2000a; White et al., 1997). Отчетливо выявляются различия между двумя конформациями комплекса GroEL/GroES. При этом наблюдаемые в электронный микроскоп структуры хорошо согласуются с кристаллической структурой.

С помощью электронной микроскопии были успешно изучены структуры молекулярного мотора для упаковки бактериофага Φ29 (Simpson et al., 2000) и мультимера нитевидного фага pIV (Linderoth et

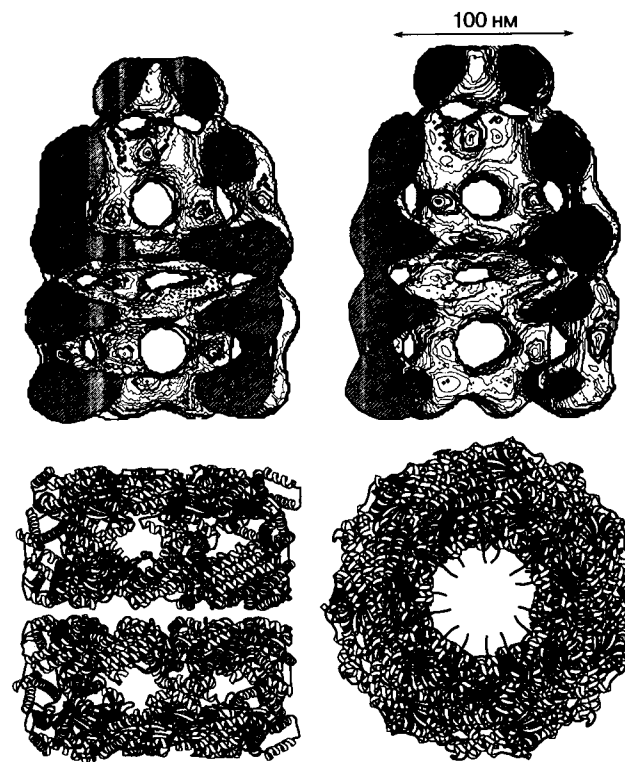


Рис. 6.18. Вверху: Электронная микрофотография двух конформаций комплекса GroEL/GroES при разрешении в 30 Å (Ranson et al., 1998; Roseman et al., 1996; Rye et al., 1999; Saibil, 2000a; White et al., 1997). Внизу: для сравнения представлена рентгеновская кристаллическая структура GroEL при разрешении в 2,4 Å (Boisvert et al., 1996; Braig et al., 1994). Последние изображения получены с использованием MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

al., 1997). Электронная микроскопия внесла весомый вклад в понимание конформационных изменений, связанных с открыванием ионных каналов в мембране (Saibil, 2000b) и с транспортом коннексина (Gaietta et al., 2002).

В грандиозных экспериментах Терри Г. Фрей (Terry G. Frey) с авторами достигли успеха в трехмерной визуализации клеточных оргanelл с помощью электронной томографии. В этом методе трехмерная структура вычисляется на основе серии микрографий образцов, полученных под разными углами (Dierksen et al., 1992; Frey, Mannella, 2000; Perkins et al., 1997a).

6.2. Сканирующий просвечивающий электронный микроскоп

В отличие от ПЭМ сканирующие электронные микроскопы сканируют поверхность образца с помощью очень тонкого луча диаметром всего в несколько ангстрем (рис. 6.19). В этом случае разрешающая способность ограничивается в основном диаметром электронного луча, падающего на образец, и радиационным повреждением.

Хотя работы по созданию СПЭМ были начаты еще в 30-х годах прошлого века, в основном путем добавления к ПЭМ отклоняющих катушек (van Ardenne, 1940), существенный прогресс был достигнут только в последние годы: электронная оптика была значительно улучшена и разрешающая способность повысилась на несколько порядков. Современные СПЭМ предоставляют беспрецедентную возможность для изучения биомолекул, позволяя определять структуры при суб-нанометровом разрешении.

Для улучшения разрешения и для химического анализа в СПЭМ, подобно ПЭМ, можно применять различную технику энергетического фильтрования, например, путем удаления нерассеянных электронов и получения неупругих темнопольных изображений (рис. 6.20). Многие СПЭМ предоставляют обе возможности — получение как упругих (рис. 6.19), так и неупругих (рис. 6.20) темнопольных изображений. Треть-

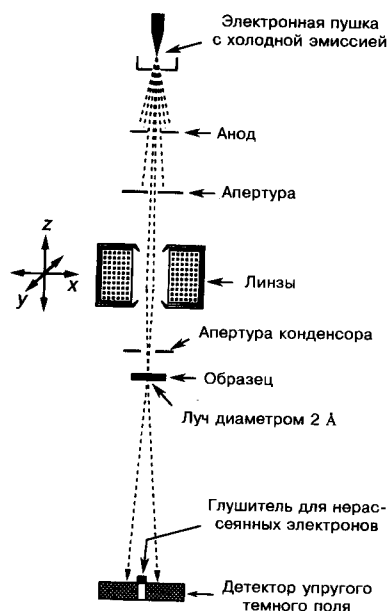
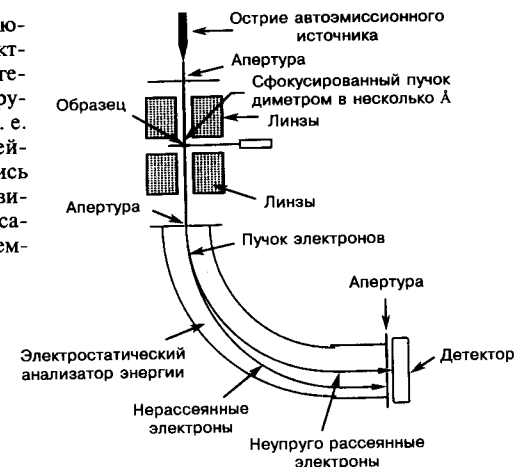


Рис. 6.19. Схема устройства сканирующего просвечивающего электронного микроскопа (СПЭМ). Линзы объектива фокусируют электронный луч на небольшом участке образца. Рассеянные электроны регистрируются с помощью упругого темнопольного детектора. Изображение генерируется путем передвижения сфокусированного луча над образцом.

Рис. 6.20. Пример сканирующего просвечивающего электронного микроскопа с энергетическим фильтром. Неупруго рассеянные электроны, т. е. те, у которых при взаимодействии с образцом изменились и энергия, и направление движения, улавливаются и тем самым получается неупругое темнопольное изображение.



им типом является яркопольное детектирование, при котором электроны улавливаются с помощью небольшой апертуры, расположенной на оптической оси, а электроны, которые теряют свою энергию, удаляются энергетическими фильтрами. Изображение получается путем отбора малоугловых упруго и неупруго рассеянных электронов.

Добавленная литература

1. Брандон Д., Каплан В. Микроструктура материалов. Методы исследования и контроля. — М.: Техносфера, 2004.
2. Мальцев А. Сканирующий зондовый микроскоп. В мире науки, 2004, № 11.
3. Миронов В. Основы сканирующей зондовой микроскопии. — М.: Техносфера, 2004.
4. Штанский Д. В. Просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения в нанотехнологических исследованиях. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2002. Т. XLVI, №5.

Зондовая сканирующая спектроскопия в Интернете:

1. <http://jan.ucc.nau.edu/~wittke/Microprobe/Column-ElectronGun.html>.
2. <http://www.nanoscopy.org/News.shtml>.
3. <http://www.spm.genebee.msu.ru/members/yaminsky/Russian/index.htm>.
4. <http://www.krugosvet.ru/articles/13/1001359/1001359a1.htm>.
5. <http://www.microscopist.ru/equipment.php?pid=5>.

Электронные книги:

1. http://www.nanoscopy.org/ebook/Pag13_17.html.
2. http://www.nanoscopy.org/ebook/cont_ru.html.

ГЛАВА 7

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Зондовые сканирующие микроскопы генерируют изображения образца с высоким разрешением путем его сканирования с помощью микроскопических механических, электрических, оптических, тепловых и иных зондов.

7.1. Атомно-силовой микроскоп

АСМ был изобретен в середине 80-х гг. Гердом Биннигом, Кристофом Гебером и Келвином Ф. Куэйтом (Binnig et al., 1986). Он является одним из представителей так называемых сканирующих зондовых микроскопов (СЗМ), к которым относятся также сканирующий туннельный микроскоп (СТМ; см. разд. 7.2; Binnig et al., 1982a; Binnig, Rohrer, 1987), сканирующий ближнепольный оптический микроскоп (СБОМ; см. разд. 7.3), сканирующий тепловой микроскоп (СТЕМ; см. разд. 7.4) и сканирующий ионную проводимость микроскоп (СИПМ; см. разд. 7.4)¹. АСМ используется как в промышленных целях для получения изображений металлических поверхностей в атомном масштабе, так и при фундаментальных исследованиях для получения изображений трехмерных профилей поверхности биологических образцов в нанометровом масштабе. Он является исключительно полезным инструментом для определения размера и конформации единичных молекул и их агрегатов, адсорбированных на твердых поверхностях. АСМ сканирует образцы с помощью тончайшего зонда (острой иглы), расположенного на свободном конце миниатюрного кантилевера² (рис. 7.1). Он измеряет слабые силы взаимодействия, возникающие между острием и поверхностью образца, определяя изменения в отражении лазерного луча,

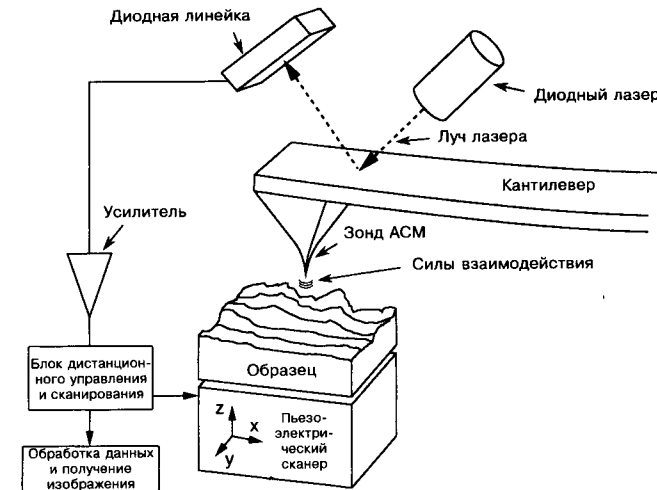


Рис. 7.1. Принцип действия атомно-силового микроскопа. Очень тонкое острие, прикрепленное к крошечному кантилеверу, зондирует поверхность образца. Оптическая система состоит из диодного лазера и детектора, каковым, например, может быть диодная линейка или позиционно-чувствительный диод. Система чувствительна к изгибам кантилевера и тем самым воспринимает зависящие от расстояния силы взаимодействия между наконечником и образцом. Для сканирования поверхности образец перемещается с помощью пьезоэлектрического манипулятора (Binnig et al., 1986).

вызванные этим взаимодействием при перемещениях кантилевера. Изображение рельефа поверхности регистрируется с помощью подвижного пьезоэлектрического предметного столика, который перемещает либо образец под острием, либо острие над поверхностью образца. Точность измерений достигает нескольких Å.

Обращает на себя внимание сходство АСМ (рис. 7.1) с шуповым профилометром (рис. 7.2) и с СТМ (рис. 7.19). Действительно, идея АСМ основана на конструкции шупового профилометра, но АСМ способен выявлять рельеф образца с субнанометровым разрешением.

Сила взаимодействия острия с образцом (рис. 7.3) обычно составляет всего лишь несколько пико- или нано-Ньютонов (пН — нН). Вот почему кантилевер должен иметь очень малую массу и несущие части АСМ (рис. 7.4 и 7.5) должны быть жесткими и оборудованы надежными устройствами гашения (демпфирования) вибраций. Три поддерживающие стойки в конструкции на рис. 7.4 ослабляют колебания. Штанги для трехкоординатной юстировки предметного столика с образцом на вершине пьезоэлектрического сканера также сконструиро-

¹ Хорошее введение в историю создания электронных микроскопов и другую полезную информацию можно найти на сайте недавно созданного Российского общества сканирующей зондовой микроскопии и нанотехнологии: <http://www.nanoworld.org/russian/museum.htm>.

² Cantilever — кантилевер, консоль, консольная (выступающая) балка, кронштейн.

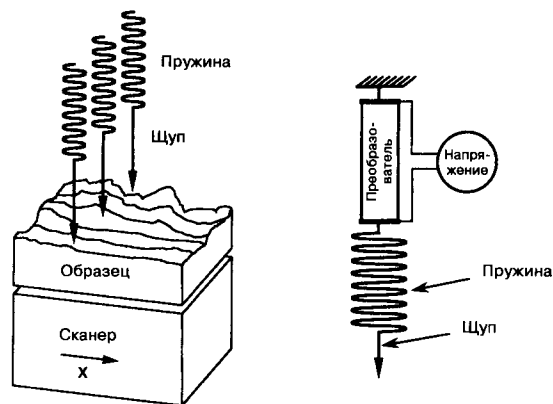


Рис. 7.2. Щуповой (игольчатый) профилометр (для сравнения с АСМ). Несколько щупов зондируют расположенный под ними образец. Небольшие перемещения щупов преобразуются в электрический сигнал с помощью линейного измерительного датчика. Прибор различает перепады уровня в несколько десятков нанометров.

ваны так, чтобы устранить малейшие колебания. Сам АСМ устанавливается на резиновой подставке, которая предотвращает перенос высокочастотных вибраций от лабораторного помещения и оборудования (не показано). Малость силы взаимодействия является решающей для достижения высокого разрешения силовой микроскопии при изучении мягких биологических образцов. Низкий коэффициент упругости кантилевера может способствовать этому, но в ущерб разрешению, поэтому наиболее распространенным способом для таких тонких измерений является ослабление интенсивности и сокращение длительности контакта с кантилевером за счет допущения его вертикальных колебательных движений, как будет разъяснено далее (рис. 7.13).

Очевидно, что для эффективности такого метода, зонд должен иметь прочный и максимально остро заточенный наконечник. Обычно диаметр окончаний фабричных наконечников составляет 10–20 нм. На рис. 7.6 показаны типичные артефакты, наблюдаемые, когда используются изношенные или ломанные наконечники или зонды с несколькими окончаниями.

Наконечники можно изготовить самостоятельно путем затачивания вольфрамовой нити на листе, покрытом алюминием (рис. 7.7). Такие наконечники пригодны также и для СТМ (разд. 7.2), но форма таких наконечников получается не слишком воспроизводимой да и вольфрам не является таким уж твердым.

В настоящее время стали доступными наконечники из нитрида кремния, которые являются наиболее прочными (рис. 7.8). Еще более

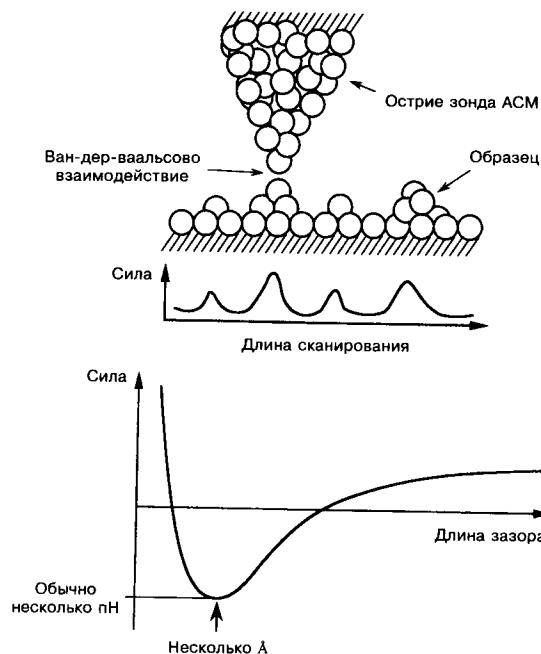


Рис. 7.3. Когда миниатюрное острие зонда приближается близко к поверхности образца, оно испытывает влияние ван-дер-ваальсовых сил, которые являются силами притяжения на расстояниях нескольких ангстрем, а на более коротких расстояниях — силами отталкивания (см., например, гл. 3 в Nölting, 1999b³). Когда зонд АСМ заряжен, основную роль играют кулоновские силы.

острые наконечники с достаточно воспроизводимой формой получают из кварца, но, к сожалению, они являются более хрупкими (рис. 7.9, а). Еще более острые наконечники, пригодные для изучения образцов с особо глубокими профилями, производят путем прикрепления высокоплотного углеродного волокна к кварцевому наконечнику (рис. 7.9, а). Остроконечные кантилеверы для изучения очень неровных поверхностей (рис. 7.10) и кантилеверы треугольной формы, которые высоко устойчивы к деформациям кручения (рис. 7.11), поставляются, например, фирмой Olympus Optical Co. (Токио).

³ Отечественные источники приведены в списке дополнительной литературы. Существуют как минимум два информативных веб-сайта «Наномир» — сайт Российского общества сканирующей зондовой микроскопии и нанотехнологии: <http://www.nanoworld.org> и «Наноскопия» — сайт компании МТ-МДТ; <http://www.nanoscopy.org>.

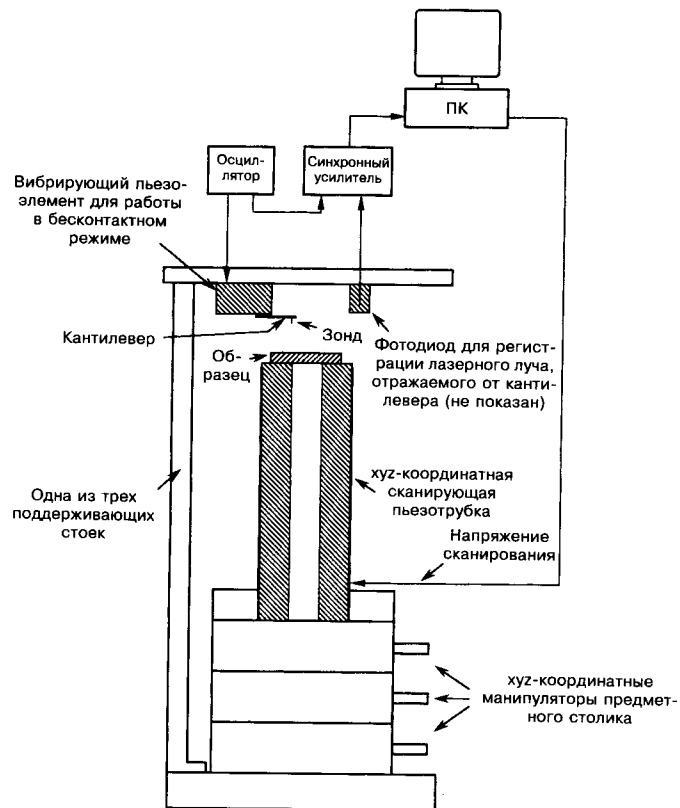


Рис. 7.4. Устройство АСМ. Сначала, манипулируя координатным предметным столиком, анализируемый участок образца осторожно сближают с зондом. Затем с помощью пьезоэлектрического манипулятора (см. также рис. 7.5) образец очень аккуратно приподнимают до возникновения взаимодействия с зондом. Это позволяет контролировать перемещения зонда с субнанометровой точностью. Фотодиод регистрирует изменения в отражении лазерного луча от кантилевера при контакте зонда с образцом. В данном случае кантилевер прикреплен к пьезоэлементу, который возбуждает вибрацию кантилевера. Синхронный усилитель регистрирует изменения этих вибраций, которые возникают вследствие взаимодействия зонда с образцом. Поверхность образца сканируется путем его перемещения в горизонтальном направлении с помощью пьезоэлектрического сканера. Сканер также удерживает кантилевер на постоянной высоте, дабы предотвратить поломку зонда и поверхности образца. Такие поломки могут приводить к артефактам (см. рис. 7.6).



Рис. 7.5. Принцип действия ху-у-координатного пьезоэлектрического сканера. Устройство представляет собой керамическую трубку, которая изменяет свои размеры в ответ на изменения прикладываемого напряжения. Изменения напряжения на х- или у-электродах вызывает изгибание трубки в горизонтальном направлении; приложение напряжения на оба электрода одновременно вызывает сжатия и расширения в вертикальном z-направлении.

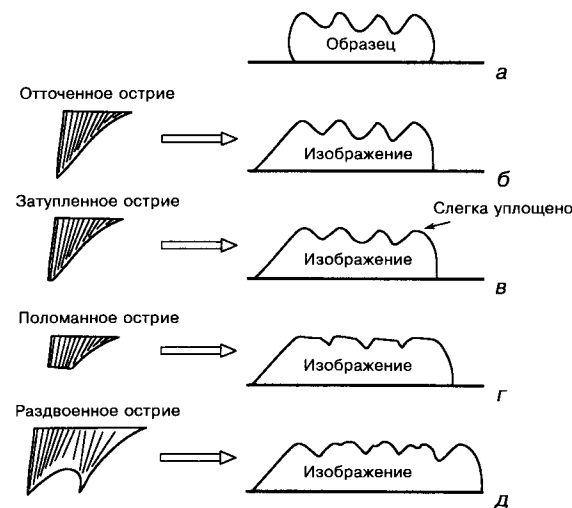


Рис. 7.6. Артефакты, вызываемые нарушениями формы зонда, для АСМ. Зонды с затупленными или поломанными остриями дают сглаженные изображения, которые зачастую бывает довольно трудно распознать как артефакты.

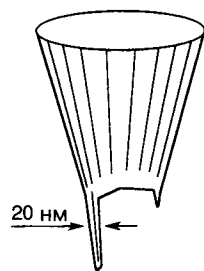


Рис. 7.7. Зонд из вольфрама. Вольфрамовую проволоку затачивают путем трения о пластину, покрытую алюминием. Такие самодельные зонды можно использовать и в СТМ (см. разд. 7.2).

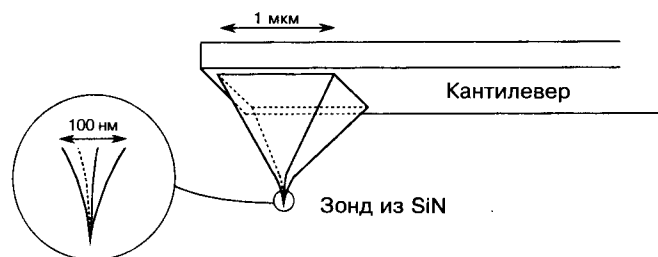


Рис. 7.8. Тонкое пирамидальное острие зонда из нитрида кремния. SiN является исключительно твердым веществом, и из него можно получать зонды с радиусом всего в несколько нанометров.

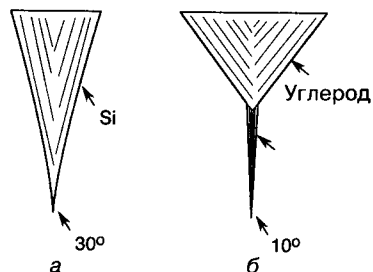


Рис. 7.9. а — зонд для АСМ из кремния; б — кремниевый зонд с присоединенным к нему волокном из углерода высокой плотности.

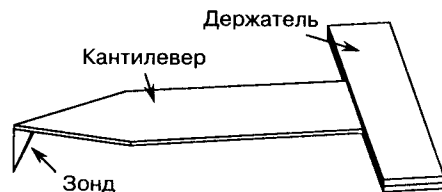


Рис. 7.10. Геометрия кантлевера для очень грубых образцов (например, Olympus Optical Co., Токио).

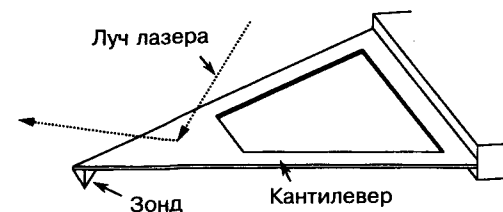


Рис. 7.11. Треугольный кантлевер. По сравнению с кантлеверами обычной формы, такая конструкция более устойчива к крутильным колебаниям (например, Olympus Optical Co., Токио).

Время жизни наконечников для АСМ резко сокращается с возрастанием прилагаемой силы (рис. 7.12). Наконечники с высоким характеристическим отношением (коэффициентом формы⁴), сделанные из кварца или углеродного волокна, обычно менее долговечны, нежели наконечники с низким коэффициентом формы, сделанные из нитрида кремния.

Существуют два основных режима работы АСМ (рис. 7.13): контактный (статичный) и подвижный (динамичный). В контактном режиме наконечник зонда постоянно находится в контакте с поверхностью образца. При этом режиме сила, с которой кантлевер давит на субстрат, может нарушать поверхность мягких биологических материалов. Динамичный режим является более деликатным, при нем наконечник зонда слегка колеблется вверх и вниз в соответствии с изменениями рельефа сканируемой поверхности образца. В динамическом режиме используют два способа: неконтактный, при котором

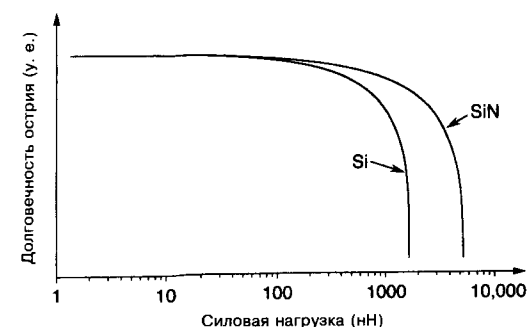


Рис. 7.12. Примеры изнашиваемости двух зондов для АСМ с остриями из разных материалов.

⁴ Коэффициент формы есть отношение высоты наконечника к его ширине.

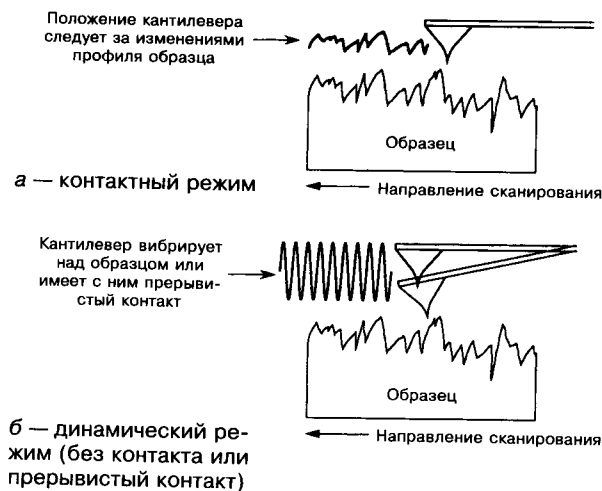


Рис. 7.13. *а* — контактный режим работы. Передвижения кантилевера следуют за изменениями профиля образца; *б* — динамический режим работы. Кантилевер имеет легкие прерывистые контакты с поверхностью образца или вибрирует над ним. Вибрации вызываются пьезокристаллом, и силы взаимодействия очень малы. Такой режим реально обеспечивает атомное разрешение микроскопа (Giessibl, 2000).

расстояние между крайней точкой наконечника и поверхностью образца всегда больше, чем ван-дер-ваальсово расстояние, и способ покалываний, при котором наконечник производит пульсирующие контакты.

Как уже было сказано, обеспечение высокой степени защиты от внешних высокочастотных вибраций является решающей для работы зондового сканирующего микроскопа с атомным разрешением. На рис. 7.14 показано одно из решений этой проблемы. Здесь АСМ сделан из очень толстых и коротких стальных плит и помещен на три резиновых шара, которые не проводят быстрых вибраций. При другом способе эффективное демпфирование достигается подвешиванием АСМ на резиновых струнах (рис. 7.15).

Важными биологическими применениями АСМ явились прямое наблюдение структуры ДНК (Lindsay et al., 1989) и отслеживание динамики нитей актина в живых клетках (Henderson et al., 1992). Прямая визуализация динамики ДНК-гликозилазы показывает, что в поисках повреждений ДНК этот фермент репарации детально перебирает неповрежденные сайты как четки, создавая изгибы в двойной спирали (Chen et al., 2002b). Образование внутримолекулярных триплексов ДНК также приводит к появлению изгибов в двойной спирали (Tiner et al., 2001). Резкие изгибы ДНК вызываются связыванием с ДНК хозяйско-

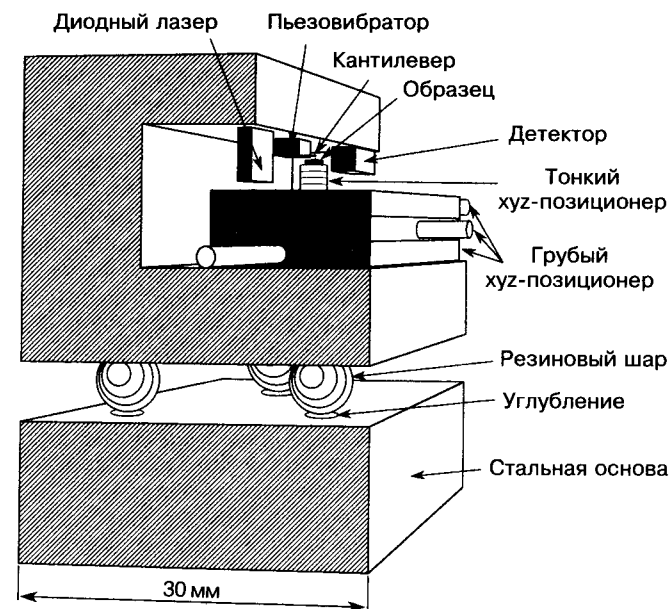


Рис. 7.14. Устойчивая конструкция АСМ с атомным разрешением. Гашение вибраций достигается жесткостью конструкции и упругой опорой в виде трех резиновых шаров.

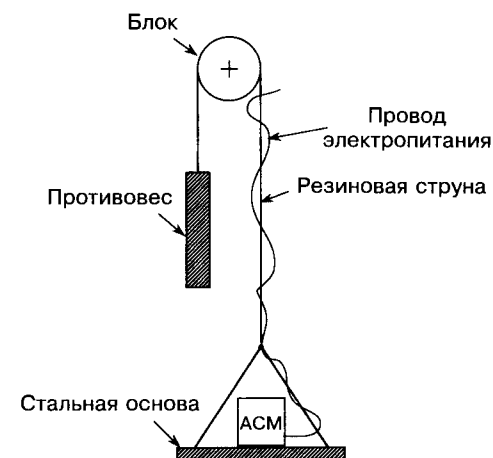


Рис. 7.15. «Висячий АСМ». Виброизоляция достигается подвешиванием на резиновой струне.

го фактора интеграции (INF) в районе, расположенном между последовательностью противоточной регуляции и промоторной областью (Seong et al., 2002). Силовая микроскопия одиночных молекул ДНК позволяет непосредственно изучать их взаимодействие с молекулами красителей (Kaji et al., 2001) и небольших биологически активных веществ (Krauthbauer et al., 2002). Достигается это путем измерения механических свойств ДНК и их изменений под действием таких молекул. Понижение ионной силы с 50 мМ до 1 мМ приводит к изменению числа узлов (перекрещиваний сегментов двойной спирали) суперспирализованной ДНК размером в 3000 п. о. с 15 до одного-двух (Cheng, Jovin, 2001). При сочетании АСМ со сканирующим ближнепольным оптическим микроскопом (СБОМ) для молекул ДНК фага с интеркалированными молекулами красителя YOYO-1 получено флуоресцентное изображение высокого разрешения и показано распределение молекул красителя (Kim et al., 2001).

АСМ несомненно является исключительно полезным инструментом для изучения белков, с помощью которого достигается уникальное понимание их структуры и физических свойств. Так, например, показано, что при pH 2 β -лактоглобулин образует тонко скрученные агрегаты с диаметром нитей около 4 нм (Ikeda, Morris, 2002). Технология АСМ была успешно использована для картирования электростатического потенциала молекулы трансмембранного канала — порина OmpF (рис. 7.16; Philippsen et al., 2002). Атомно-силовые микроскопы позволяют получать важную топологическую информацию об адгезии клеток крови на различных сенсорных материалах (Hildebrand et al., 2001). Показано, что пептиды Ac-GWWL(AL)_nWWA-Etn вызывают образование строго упорядоченных доменов в некоторых биомембранах (Rinia et al., 2002). Головки бактериофагов ФКЗ и Т4 обладают разной степенью сжимаемости (Matsko et al., 2001). Атомно-силовая микроскопия выявила слияние пор в апикальной цитоплазматической мембране живых панкреатических клеток (Cho et al., 2002) и рост β -амилоидоподобных фибрилл при болезни Альцгеймера (Goldsbury et al., 2001). С помощью АСМ показано, что сердечные и скелетные мышцы проявляют различную вязкость и эластичность. Клетки сердечной мышцы являются более жесткими (модуль упругости = 100 ± 11 кПа), чем клетки скелетных мышц (модуль упругости = 25 ± 4 кПа; см. Mathur et al., 2001). Атомно-силовая микроскопия позволяет визуализировать структуру биомолекул в растворе при физиологических условиях и получать топографические изображения при нанометровом разрешении. Примером может служить изучение сложного нативного комплекса шаперона из *Sulfolobus solfataricus* (Valle et al., 2001). Атомно-силовая микроскопия является также превосходной техникой для изучения начальных событий при взаимной адгезии клеток (Razatos, 2001). На атомно-силовых изображениях мономолекулярных пленок бычьего сывороточного альбумина можно различить отдельные мономеры и димеры (рис. 7.17; Gunning et al., 1996; Morris et al., 1999).

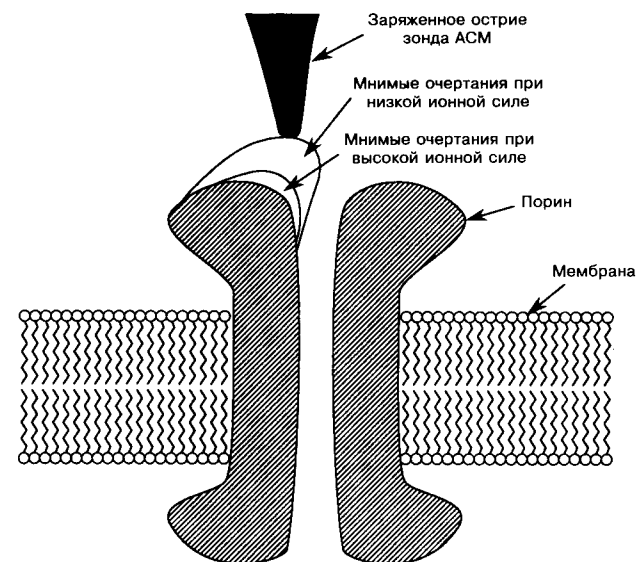


Рис. 7.16. Формирование изображения на основе измерения электростатического потенциала для белка трансмембранного канала — порина OmpF (Phillipsen et al., 2002). При различной ионной силе наблюдаются мнимые изменения формы порина, на самом деле являющиеся изменениями электростатического потенциала, которое замеряет заряженное острие зонда АСМ.

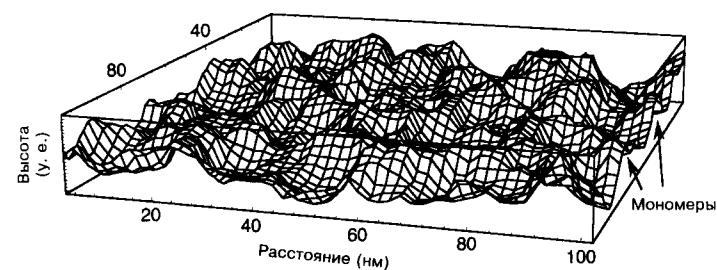


Рис. 7.17. Изображение мономолекулярной пленки белка — бычьего сывороточного альбумина (БСА, $M_{w, \text{мономер}} = 66$ кДа), адсорбированного на поверхности раздела масло-вода (Gunning et al., 1996; Morris et al., 1999). Хорошо различимы мономерные и димеры БСА.

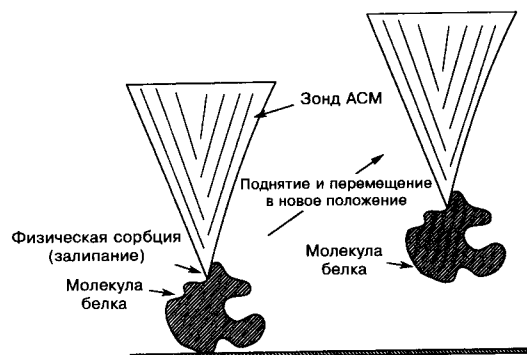


Рис. 7.18. Манипуляции с молекулой белка с помощью АСМ. Острие опускается до тесного соприкосновения с макромолекулой. Благодаря ван-дер-ваальсовым силам притяжения макромолекула прилипает к острию и может быть приподнята и перенесена в другое место.

Атомно-силовые микроскопы оказались также очень удобными для манипулирования отдельными макромолекулами: механическим касанием молекулу белка можно абсорбировать на острие зонда, приподнять и перенести в другое место (рис. 7.18). Чувствительность кантилевера к силам порядка пиконьютонов (пН) была использована для измерения сил сворачивания-разворачивания внутри одиночных молекул белка и сил отрыва между различными биомолекулами (Allison et al., 2002; Jiao et al., 2001). Атомно-силовая микроскопия поражает своей способностью проникать в тонкости динамики самосборки белков и механизмов их разворачивания (Furuike et al., 2001; Yip, 2001). О других интересных применениях АСМ см. гл. 8.

7.2. Сканирующий туннельный микроскоп

В 1986 г. Герд Бинниг и Генрих Ройер получили Нобелевскую премию по физике за изобретение СТМ. Это был первый представитель семейства сканирующих зондовых микроскопов (СЗМ), которые могут определять морфологию поверхностей с разрешающей способностью до отдельных атомов. Принцип работы СТМ основан на квантовом явлении прохождения электронами сквозь потенциальный барьер, который образован разрывом электрической цепи — небольшим промежутком (туннельным зазором) между зондирующим микроострием и поверхностью образца (туннельный эффект)⁵. Поэтому в отличие от АСМ для его ра-

⁵ В квантовой механике под туннельным эффектом подразумевается прохождение частиц сквозь потенциальный барьер, когда полная энергия частиц меньше высоты этого барьера.

боты требуются электропроводящие образцы и зонды (рис. 7.19). Между металлическим острием и поверхностью исследуемого проводника прикладывают электрическое напряжение (от единиц мВ до В) и острие приближают к поверхности образца до появления туннельного тока. Расстояние между острием зонда и поверхностью объекта составляет доли нанометра ($< 10 \text{ \AA}$) (рис. 7.20). Поскольку туннельный ток зависит также от химической природы образца и зонда, СТМ можно использовать для определения электронных свойств образцов.

При изучении белков существенными препятствиями на пути достижения высокой разрешающей способности являются нежелательное возбуждение мягкого биологического материала под действием прикладываемого тока (обычно порядка пА — нА) и распределение проводимости внутри образца, которые искажают изображение (рис. 7.21). Для получения изображений высокого разрешения требуются малая сила тока и прочное прикрепление образца к подложке.

Как и в атомно-силовой микроскопии качество острия зонда является решающим для достижения высокого разрешения (рис. 7.7—7.11, 7.22). Обычно зонды заостряют либо путем механической микрообра-

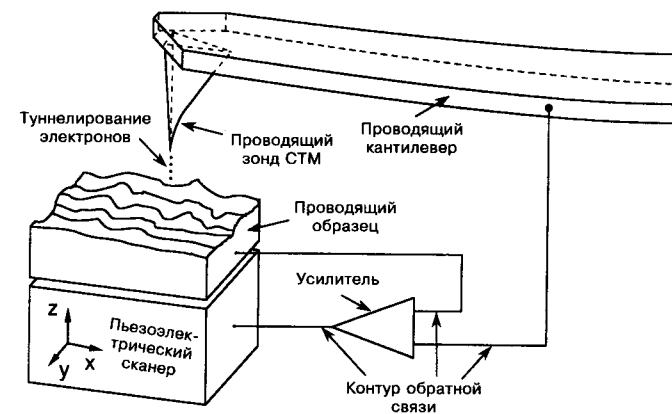


Рис. 7.19. Принцип действия СТМ. Тонко заостренное токопроводящее острие сначала приближают к образцу на расстояние около 1 нм с помощью механического манипулирования предметным столиком (не показан) и пьезоэлектрического сканера. На таком близком расстоянии электроны туннелируют сквозь щель между острием и образцом (рис. 7.20). Туннельный ток зависит от приложенной разности потенциалов между острием и образцом, от расстояния между ними, от формы острия и от химического состава, как образца, так и острия. Контур обратной связи обеспечивает постоянную высоту или постоянный ток. Туннельный ток и напряжение контура являются мерой морфологии поверхности и ее состава (Binnig et al., 1982a, в; Binnig, Rohrer, 1987).

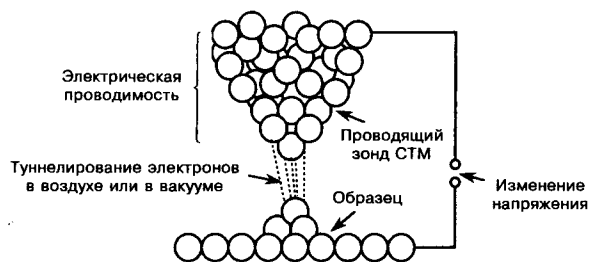


Рис. 7.20. Когда расстояние между проводящим острием и проводящим образцом уменьшается до нескольких ангстрем, электроны могут преодолевать это расстояние с некоторой вероятностью. СТМ измеряет не само расстояние, как это делает САМ, а локальную плотность электронов.

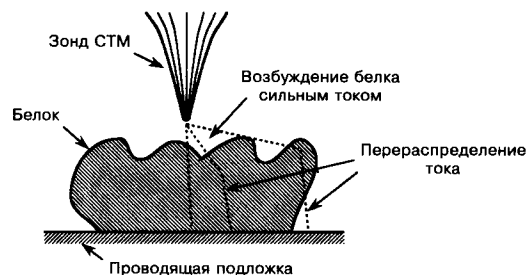


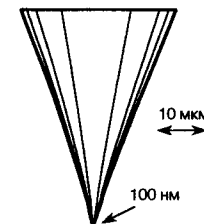
Рис. 7.21. При измерениях в СТМ крупных биологических структур ток сквозь них может проходить разными путями. Это понижает разрешающую способность и усложняет интерпретацию результатов.

ботки, либо электрохимическим травлением, и радиус острия составляет 5–100 нм.

С помощью СТМ получены изображения для смеси K244C цитохрома P450_{cam} и путидаредоксина в соотношении 1:1, адсорбированной на золоте (111)⁶. На них выявляются регулярные структуры, образованные парами этих белков (Djuricic et al., 2002). С помощью тотального потенциостатического слежения за реакцией переноса электрона во время получения изображения показано, что пластоцианин 121C/E25C практически полностью сохраняет свои нативные восстановительно-

⁶ (111) — стандартное обозначение для параметров элементарной ячейки кристалла: $a_0 = 1$; $b_0 = 1$; $c_0 = 1$; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 90^\circ$; федоровская группа симметрии: $m\bar{3}m$, $3L_4 4L_3 6L_2 9PC$; федоровская группа: $Fm\bar{3}m$. См. «Кристалл» — интерактивное справочно-учебное пособие по кристаллографии: Золото. <http://www.giscenter.ru/iso/sys/crystall/ASP/crystal.asp?code=96>. Справочник по кристаллографии, ИРЦГИТ СО РАН: <http://www.giscenter.ru/iso/sys/crystall/content.html>.

Рис. 7.22. Травленное вольфрамовое острие для СТМ (см. также рис. 7.7–7.11).



окислительные свойства при иммобилизации на золотом субстрате (Andolfi et al., 2002). С помощью СТМ показано, что почти линейные молекулы металлотионеина-2 млекопитающих в присутствии АТФ изгибаются в своей центральной части, образуя между доменами угол примерно в 20° (Maret et al., 2002). Электрохимическая сканирующая туннельная микроскопия тиол-модифицированной ДНК, иммобилизованной на поверхности одиночного кристалла золота (111), показала, что при наложении напряжения в диапазоне от 200 до 600 мВ ориентация ДНК претерпевает потенциал-зависимые изменения (Zhang et al., 2002b). Изучение морфологии и особенностей транспорта электронов в цитохроме доказывает существование последовательных дискретных электрон-туннелирующих эффектов (Khomutov et al., 2002). Туннелирование в белках, адсорбированных на проводящем субстрате может зависеть от прилаемого напряжения (Facci et al., 2001). Сопrotивление единичной молекулы октандитиола составляет 900 МОм (Cui et al., 2001). Современная генная инженерия позволяет вводить сайт-специфично остатки цистеина в конструируемые метки, такие как гистидиновые зацепки и биотин-связывающие пептиды. В результате можно «по заказу» получать иммобилизованные белковые структуры, у которых теперь можно изучать одновременно и электрохимические и топографические свойства, используя сканирующую зондовую микроскопию и циклическую вольтамперометрию (Gilardi et al., 2001).

7.3. Сканирующий ближнепольный оптический микроскоп

7.3.1. Преодоление ограничений классической оптики

В сканирующих ближнепольных оптических микроскопах (рис. 7.23–7.25) используется луч света с диаметром меньшим, чем длина волны источника (Ash, Nichols, 1972; Betzig et al., 1986, 1991, 1992; Egawa et al., 1999; Heimel et al., 2001; Pohl et al., 1984; Syngé, 1928; Toledo-Crow et al., 1992; Williamson et al., 1998). С помощью такого технологического новшества достигается настолько высокая степень разрешения микроскопа, что она лежит далеко от предела разрешения Аббе-Фурье d классической оптики (см. также разд. 6.1.2):

$$d = \frac{\lambda}{n \sin(\alpha)}, \quad (7.1)$$

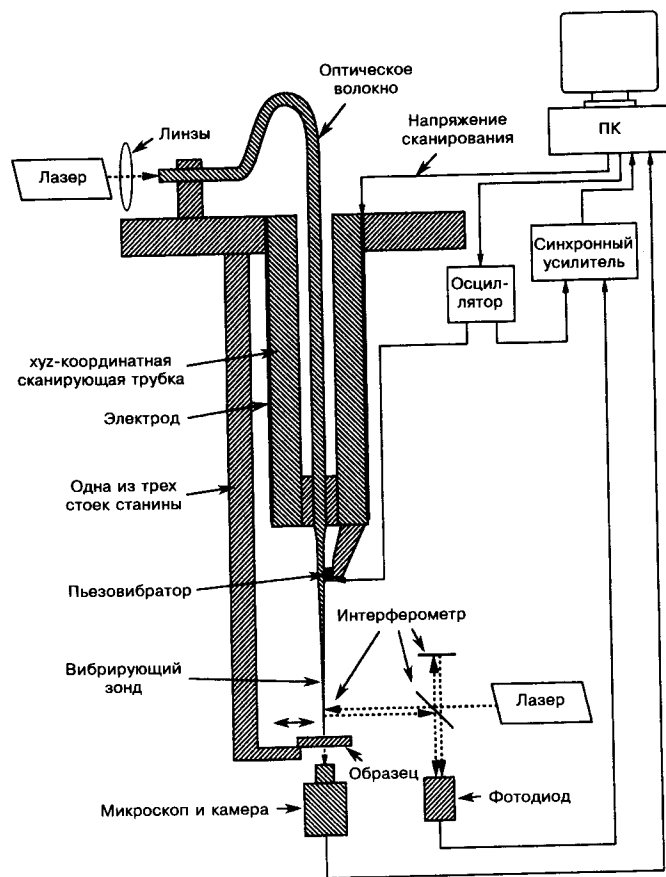


Рис. 7.23. Устройство СБОМ. Оптический зонд испускает свет из точек над двухмерным образцом. Острие волнового зонда приобретает преимущества физического действия оптического туннелирования. В этом СБОМ это достигается использованием клиновидного стеклянного волокна, покрытого металлом. Первое утончение было достигнуто расплавлением с растягиванием, а второе — на самом кончике зонда — было получено травлением. Гашение горизонтальных вибраций зонда, которые вызываются поперечными силами, используется как мера расстояния до образца. Контур обратной связи для поперечных сил, который производит интерферометрические измерения горизонтальных смещений острия, удерживает его на постоянной высоте (Betzig et al., 1992). Ближнепольные оптические свойства поверхности образца картируются путем сканирования каждой точки в пределах заданной области.

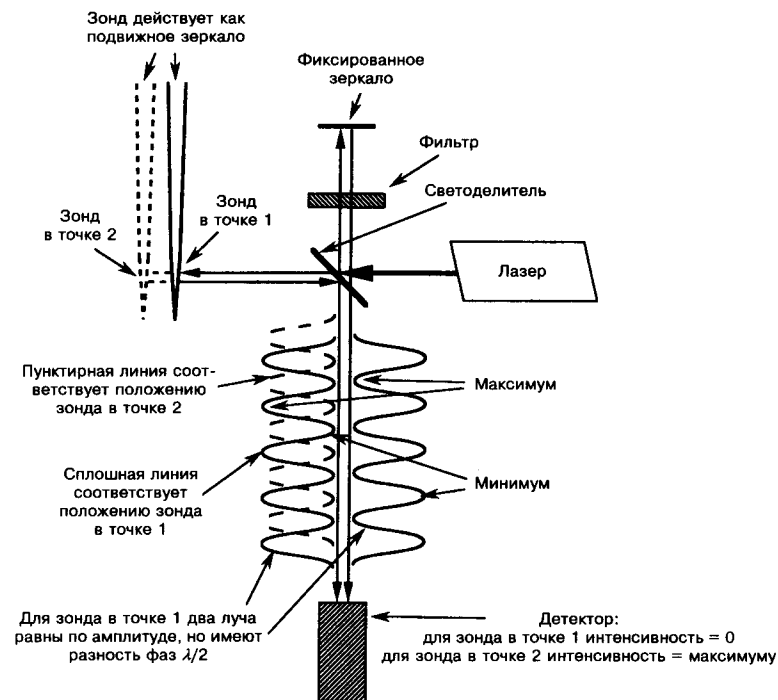


Рис. 7.24. Устройство интерферометра, используемого для регистрации поперечных сил в зонде, для СБОМ. Принцип его действия основан на измерении интерференции двух лучей света с одинаковой амплитудой, которые попадают в детектор от двух зеркал — неподвижного и подвижного, в качестве которого выступает острие зонда. В точке 1 оба пучка находятся в противофазе с $\lambda/2$, и сигнал на детекторе отсутствует. При небольшом смещении острия в точку 2 происходит небольшой сдвиг фазы для этих двух пучков, что приводит к появлению сигнала на детекторе. Световой фильтр на пути фиксированного луча обеспечивает равенство амплитуд двух интерферирующих лучей.

где λ , n и α суть длина волны в вакууме, коэффициент преломления среды в пространстве между образцом и объективом и половинный угол апертуры, соответственно. Для видимого света с $\lambda = 500$ нм, $n = 1,6$ и α около 90° предел разрешения классической оптики составляет примерно $d = 300$ нм. Можно снизить этот предел, если использовать УФ-свет и компьютерную обработку (процессинг) изображений, но, как это явствует из уравнения 7.1, для классической оптики он будет лишь немного ниже $d = 100$ нм. СБОМы оказались первыми оптическими микроскопами, которые существенно преодолели предел, задаваемый уравнением 7.1.

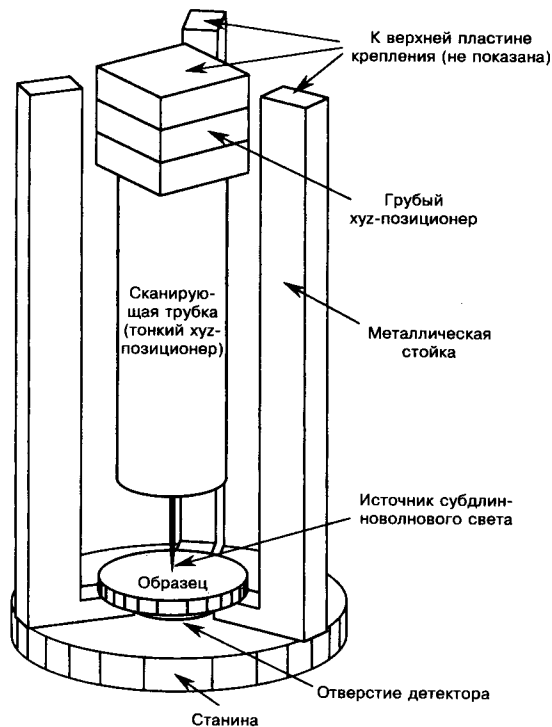


Рис. 7.25. Устройство СБОМ с грубым и тонким хуз-позиционерами.

Основные принципы работы СБОМов показаны на рис. 7.23—7.25. Источник света парциальной длины волны располагается над поверхностью образца на расстоянии в несколько мкм. Осуществляется это сначала с помощью грубой механической юстировки, а потом путем тонкой доводки с помощью пьезоэлектрического перемещающего устройства, например, пьезоэлектрической сканирующей трубки. Пропускание измеряется непосредственно под образцом. Изображение поверхности образца получается вследствие перемещения источника света (или в некоторых конструкциях — образца) в горизонтальном направлении с помощью пьезоэлектрического перемещающего устройства. Дабы избежать разрушения образца во многих СБОМах источник света слегка вибрирует над поверхностью образца, и вибрации гасятся посредством регистрации силы взаимодействия источника с образцом. Когда гашение усиливается, пьезоэлектрическое перемещающее устройство слегка приподнимает источник света парциальной длины волны (или опускает образец). Ближнепольное оптическое возбуждение образца можно наблюдать как перенос энергии диполь-дипольного взаимодействия (Sekatskii, Dietler, 1999).

У СБОМ фактически отсутствует предел разрешения. Их возможности ограничены прежде всего техническими причинами, такими как возможность производить источники света достаточно малого размера (см. следующий раздел) и регистрировать очень малые различия в интенсивности света, прошедшего сквозь слои образца.

7.3.2. Конструкция апертуры для субдлинноволновой оптики

Наиболее распространенными способами производства апертур парциальной длины волны являются:

1) адиабатическое натяжение оптических волокон при нагревании (Betzig et al., 1991; Williamson, Miles, 1996; рис. 7.26, а и 7.27);

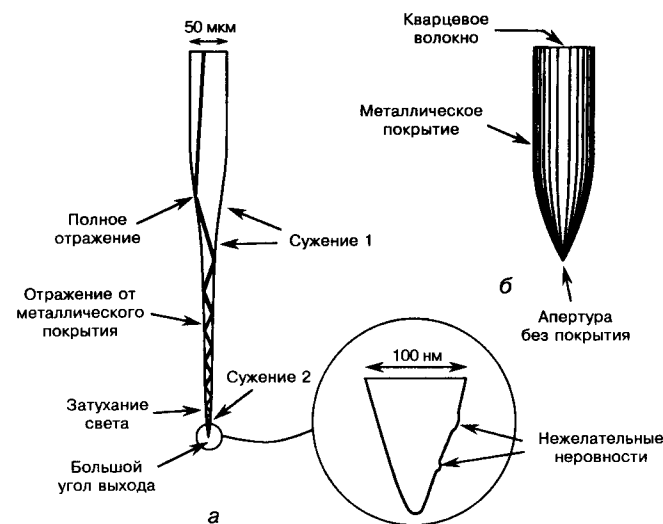


Рис. 7.26. а — плавленно-тянутый зонд. В верхней части такого зонда свет отражается от стенок посредством полного внутреннего отражения (ПВО). ПВО есть такое явление, при котором весь попадающий свет отражается от границы раздела. Это происходит тогда, когда имеют место два обстоятельства: (i) свет перемещается в более оптически плотной среде и достигает менее оптически плотной среды и (ii) угол падения больше, чем так называемый критический угол. б — травленный зонд. Желательная высокая яркость получается при большом конусном угле. Оптическая апертура формируется путем напыления на травленное волокно светонепроницаемого металла, например, алюминия с помощью его ротационного испарения.

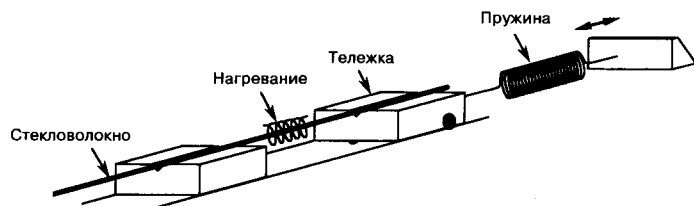


Рис. 7.27. Производство зонда путем адиабатического растяжения опто-волокну при нагревании (плавление с растяжением; см. Williamson, Miles, 1996).

2) травление (Muramatsu et al., 1999) в специальной травильной трубке (Stöckle et al., 1999a; Turner, 1983; рис. 7.26, б и 7.28);

3) микрообработка (Mitsuoka et al., 2001; Schurmann et al., 2000), например, путем ионного травления (см. Veerman et al., 1998).

Вышеупомянутые острия зондов обычно покрывают металлом. Светопропускание острия сильно зависит от расстояния между срезом острия и апертурой (рис. 7.29). Поэтому у травленного острия с конус-

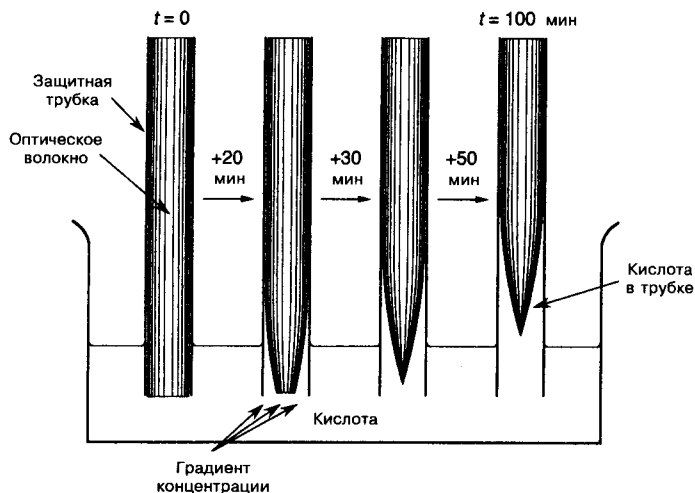


Рис. 7.28. Травление кварцевого волокна плавиковой кислотой (HF) в трубках (Stöckle et al., 1999a,b; Turner, 1983). Острие формируется вследствие образования в процессе травления градиентов концентрации кислоты и растворенного волокна. Защитная трубка служит также для предотвращения конвекции кислоты. Получаемые острия недороги и имеют большой конусный угол и, соответственно, высокий коэффициент использования света.

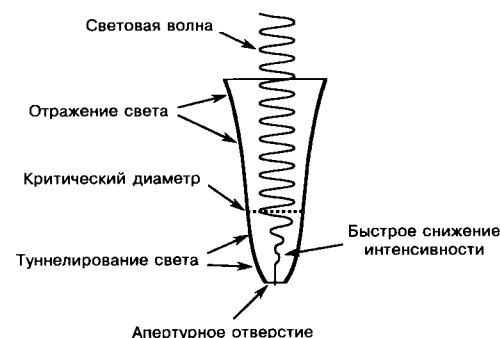


Рис. 7.29. Распространение световой волны в острие зонда для СБОМ. До диаметра острия, примерно равного длине волны, свет перемещается с очень небольшим ослаблением. За этим критическим диаметром интенсивность света быстро снижается.

ным углом около 30° оптическая пропускная способность обычно на 2—3 порядка лучше, чем у оптико-волоконных зондов. Возможно, однако, производить и более яркие источники (рис. 7.30).

В упомянутых методах производства источников света ограничением на размер источника является пропускание света тонким слоем металла (рис. 7.31). Поэтому очень трудно получить источники диаметром меньше 10 нм, просверливая отверстие в металлической пластине или в оптическом волокне, так как свет будет проходить через стенки отверстия. В источниках света меньшего размера используют мелкие флуоресцирующие частицы (рис. 7.32).

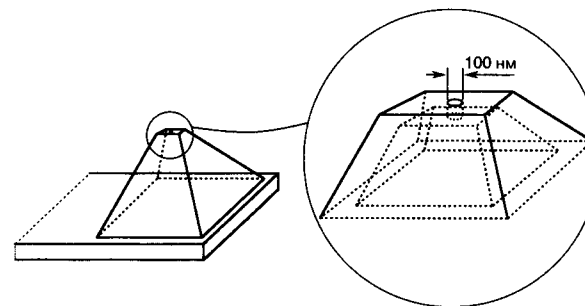


Рис. 7.30. Острие для СБОМ из нитрида кремния. Оно произведено с использованием фотолитографии, травлением гидроксидом калия и нанолитографией с помощью пучка электронов (Zhou et al., 1998, 1999).

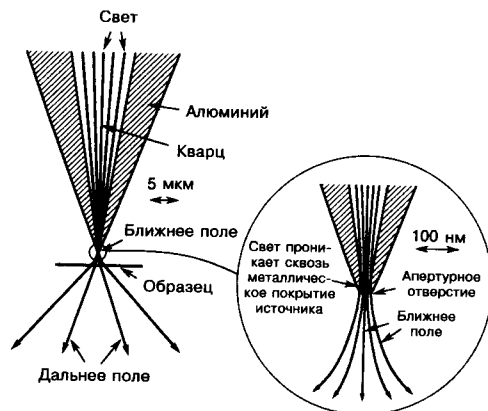


Рис. 7.31. Дальнее и ближние оптические поля в окрестности окончания миниатюрного оптического острья для СБОМ. Поскольку свет может проходить через тонкие слои металла, диаметр луча в такой конструкции не может быть меньше, чем несколько десятков нанометров.

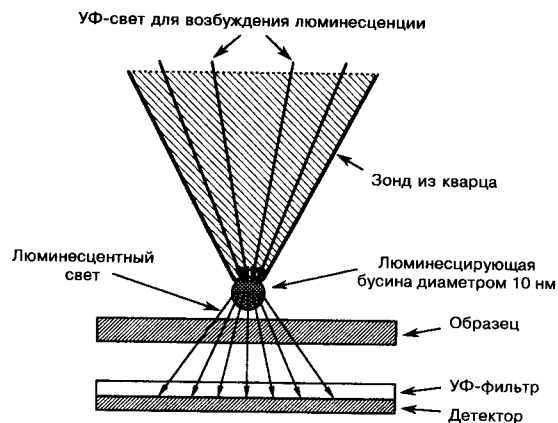


Рис. 7.32. Источник света размером в 10 нм для СБОМ, сделанный из люминесцирующего материала. УФ-свет вызывает люминесценцию бусины размером в 10 нм на конце зонда. Прохождение люминесцентного света через образец регистрируется детектором, который покрыт УФ-поглощающим слоем. Для усиления стабильности и долговечности люминесцентного материала к нему могут добавляться антиоксиданты. Разрешающая способность для тонкослойных образцов, проявляемая такого типа источниками света, зависит от размера люминесцирующей бусины и способности регистрировать небольшие различия в поглощении света.

7.3.3. Примеры применения СБОМ

Ценные применения СБОМ находят в клеточной биологии, микробиологии (Meixner, Knerre, 1998) и протеомике (Gao et al., 2001). С их помощью были визуализированы изображения доменов основного комплекса фотосистемы II, связанного с липидными монослоями (Trudel et al., 2001). Используя СБОМ-АСМ, снабженный тонким ступенчато травленным оптико-волоконным зондом, можно наблюдать в пленках Лангмюра-Блоджетта распределение топографических, фрикционных, флуоресцентных и поверхностных потенциалов одновременно (Hogiuchi et al., 1999). На рис. 7.33 представлено изображение с разрешением в 50 нм.

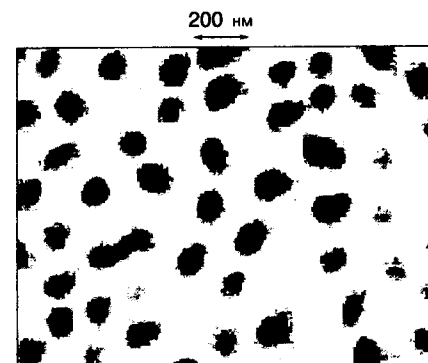


Рис. 7.33. Изображение бусинок латекса диаметром примерно 10 нм, полученное с помощью СБОМ при разрешении около 50 нм (OMICRON, Taunusstein, Германия).

7.4. Микроскоп, сканирующий ионную проводимость, сканирующий тепловой микроскоп и другие зондовые сканирующие микроскопы

Полезными сканирующими зондовыми микроскопами являются также магнитно-силовой микроскоп; зондовый микроскоп, сканирующий эффект Холла (Chang et al., 1992a,b); фрикционно-силовой микроскоп⁷ (рис. 7.34; Howald et al., 1995); микроскоп, сканирующий ионную проводимость (рис. 7.35; Bruckbauer et al., 2002a, Hansma et al., 1989; Korch

⁷ Сканирующий фрикционно-силовой микроскоп производит атомные изображения в режиме сил трения.

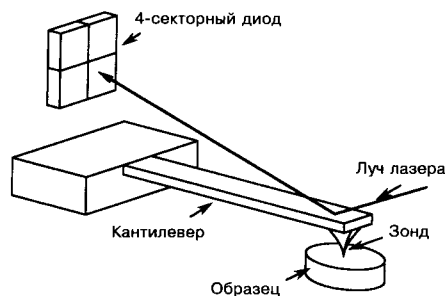


Рис. 7.34. Пример фрикционно-силового микроскопа. Детектор имеет секторы для измерения в горизонтальном и вертикальном направлениях, что дает возможность измерять деформации кручения кантилевера и вычислять (поперечные) силы торможения (см. Howald et al., 1995).

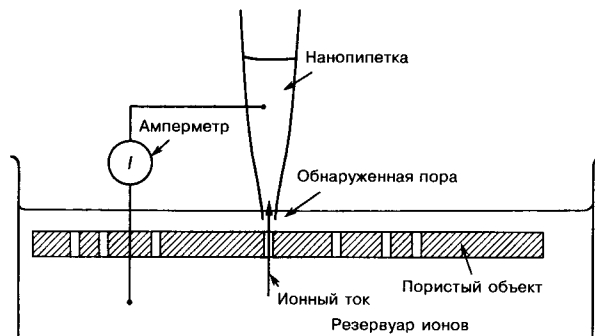


Рис. 7.35. Обнаружение пор в мембране с помощью микроскопа, сканирующего ионную проводимость. Зондом является нанопипетка, заполненная раствором электролита. Ток между пипеткой и резервуаром ионов начинает возрастать, когда острiente пипетки достигает поры. Такая техника позволяет определять распределение и размер пор с разрешением до 100 нм.

et al., 1997, 2002 a,b; Stachelberger, 2001), и сканирующий тепловой микроскоп (рис. 7.36; Mills et al., 1989, 1999). Существуют два основных типа тепловых зондов для сканирующих тепловых микроскопов: термопары и терморезисторы. Термопарный зонд на рис. 7.36 состоит из двух проволоночек, изготовленных из двух различных металлов, которые раздваиваются на конце тупоугольной пирамидки из нитрида кремния (Mills et al., 1998). Его возможное биофизическое применение может заключаться в исследовании локальных тепловых эффектов в биологических тканях в процессе клеточного метаболизма.

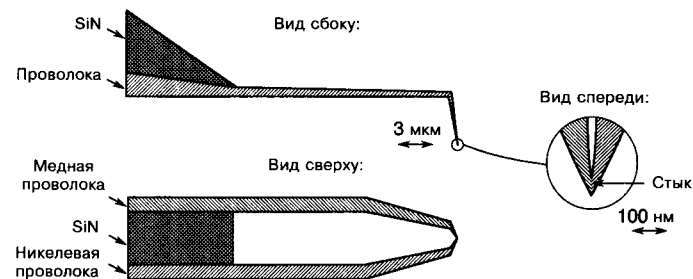


Рис. 7.36. Конструкция острья для сканирующего теплового микроскопа (Mills et al., 1998, 1999). Медь-никелевая (Cu/Ni) термопара субмикрометрового размера на конце кантилевера способна измерять тепловое микроокружение.

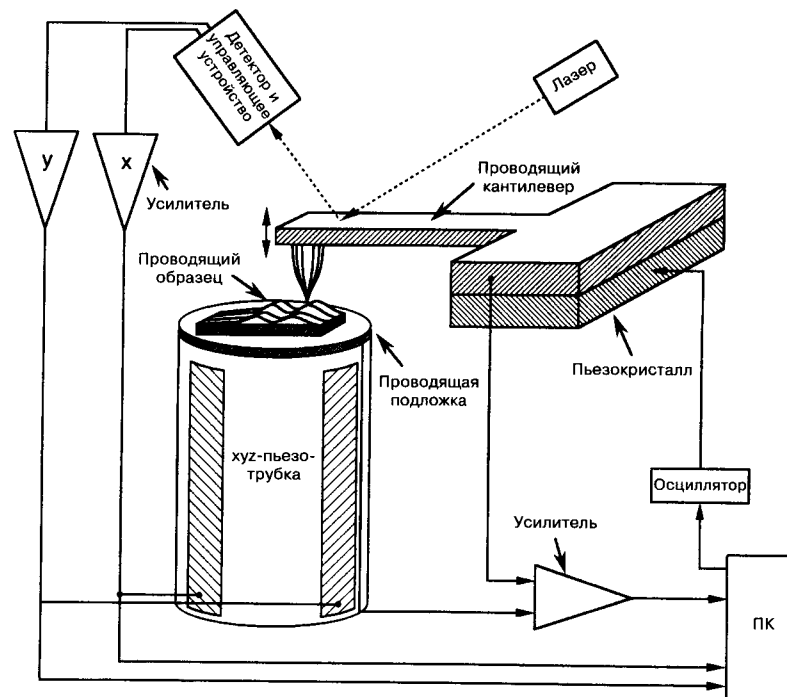


Рис. 7.37. СТМ с возможностями АСМ. АСМ и СТМ регистрируют различные физические свойства. Получаемая совместная информация обеспечивает значительно большее проникновение в химическую природу образца и его физико-химические свойства.

СТМ с возможностями АСМ (рис. 7.37) обеспечивает получение информации одновременно о рельефе поверхности и химическом составе изучаемого образца.

Добавленная литература

1. АСМ. <http://psj.nsu.ru/departments/semic/newsheglov/4.html>.
2. Бахтизин Р.З. Сканирующая туннельная микроскопия — новый метод изучения поверхности твердых тел. Соросовский образовательный журнал. Т. 6. № 11. 2000. С. 1—7. <http://www.nanoworld.org/NanoLibrary/bakhtizin.pdf> http://www.issep.rssi.ru/pdf/0105_110.pdf.
3. Библиотека. <http://www.nanoworld.org/russian/library.htm>.
4. Бинниг Г., Рорер Х. Сканирующая туннельная микроскопия — от рождения до юности. В кн.: Атомы «глазами» электронов (Актуальные проблемы физики). — М.: Знание. 1988.
5. Галерея микрографий биологических и молекулярнобиологических объектов. http://ru.ntmdt.ru/Scan-gallery/Life_Sciences.
6. Галлямов М.О., Яминский И.В. Сканирующая зондовая микроскопия: основные принципы, анализ искажающих эффектов. http://www.nanoscopy.org/E_Book.html. <http://www.nanoscopy.org/Tutorial.html>.
7. Киселев Г.А. Обзорная статья по AFM зондам. http://www.nanoscopy.org/E_Book.html.
8. Лившиц В.Г. (2001) Современные приложения сканирующей туннельной микроскопии для анализа и модификации поверхности. Соросовский образовательный журнал, Т. 7, № 5. http://www.issep.rssi.ru/pdf/0105_110.pdf.
9. Наномир — галерея слайдов. <http://www.nanoworld.org>.
10. Наноскопия — галерея изображений. <http://www.nanoscopy.org/Gallery.html>.
11. Словарь. <http://www.nanoworld.org/spmglossary/glossindex.htm>.
12. Справочник по кристаллографии. НРЦГИТ СО РАН: <http://www.giscenter.ru/iso/sys/crystal/content.html>.
13. Тишин А.М., Яминский И.В. Магнитно-силовая микроскопия. Учебное руководство. <http://www.nanoscopy.org/Tutorial.html>.
14. Штанский Д.В. Просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения в нанотехнологических исследованиях. Рос. хим. ж., Т. 46, 2002. № 5. <http://www.chem.msu.su/rus/journals/jvho/2002-5/81.pdf>.
15. Электронная книга. Яминский И.В. Взгляд в микромир: от атомов и молекул — до живых клеток. Яминский И.В. Зондовая микроскопия: методы и аппаратура. Филонов А.С., Яминский И.В. Зондовая микроскопия: построение и обработка изображений. Галлямов М.О., Яминский И.В. Нуклеиновые кислоты. http://www.nanoscopy.org/E_Book.html.
16. Яминский И.В. Сканирующие зондовые микроскопы. В кн: Современное естествознание: энциклопедия. В 10 т. Т. 1: Физическая химия. С. 252—255.
17. Яминский И. Закон Ома для разомкнутой цепи и... туннельный микроскоп. Квант. <http://www.nanoscopy.org/tutorial/MAFM/magnit.pdf>.

ГЛАВА 8

БИОФИЗИЧЕСКИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ

8.1. Измерение сил в одиночных белковых молекулах

С помощью техники атомно-силовой микроскопии (АСМ) можно индуцировать и проследивать сворачивание отдельных белковых молекул. Опыты с белком титином, который является основным компонентом скелетных мышц (рис. 8.1—8.3), выявили, что сила сворачивания этих индивидуальных доменов с поперечным сечением менее 5 нм^2 составляет $100\text{—}300 \text{ пН}$ и зависит от скорости вытягивания (Carrion-Vasquez et al., 1999; Gaub, Fernandez, 1998; Rief et al., 1997). Подобное исследование бактериородопсина показало, что его спирали удерживаются в бактериальной мембране с силой $100\text{—}200 \text{ пН}$ (рис. 8.4; Osterhelt et al., 2000). Аналогично силовая спектроскопия одиночной молекулы шелка ловчей сети паука выявила, что при развертывании молекулы происходит ряд разрывов, что свидетельствует о модульном строении отдельной молекулы шелка (Oroudjev et al., 2002). Минимальный раз-

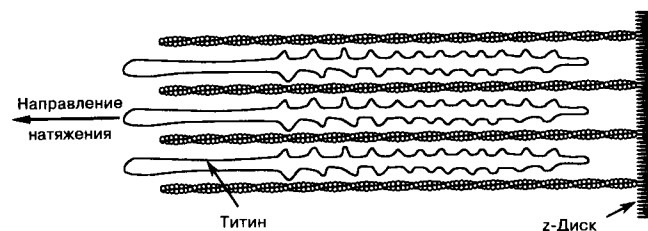


Рис. 8.1. Молекулярная архитектура волокон скелетной мышцы. Техника АСМ внесла свой вклад в понимание роли индивидуальных молекул титина в этих волокнах: некоторые белки скелетной мышцы способны выдерживать удельное натяжение в $27 \cdot 10^9 \text{ Па}$ (см. рис. 8.2 и 8.3; Carrion-Vasquez et al., 1999; Gaub, Fernandez, 1998; Rief et al., 1997)¹.

¹ В оригинале: 600 кр см^{-2} , т. е. 600 килофунтов на квадратный сантиметр (1 килофунт = 453,6 кг).

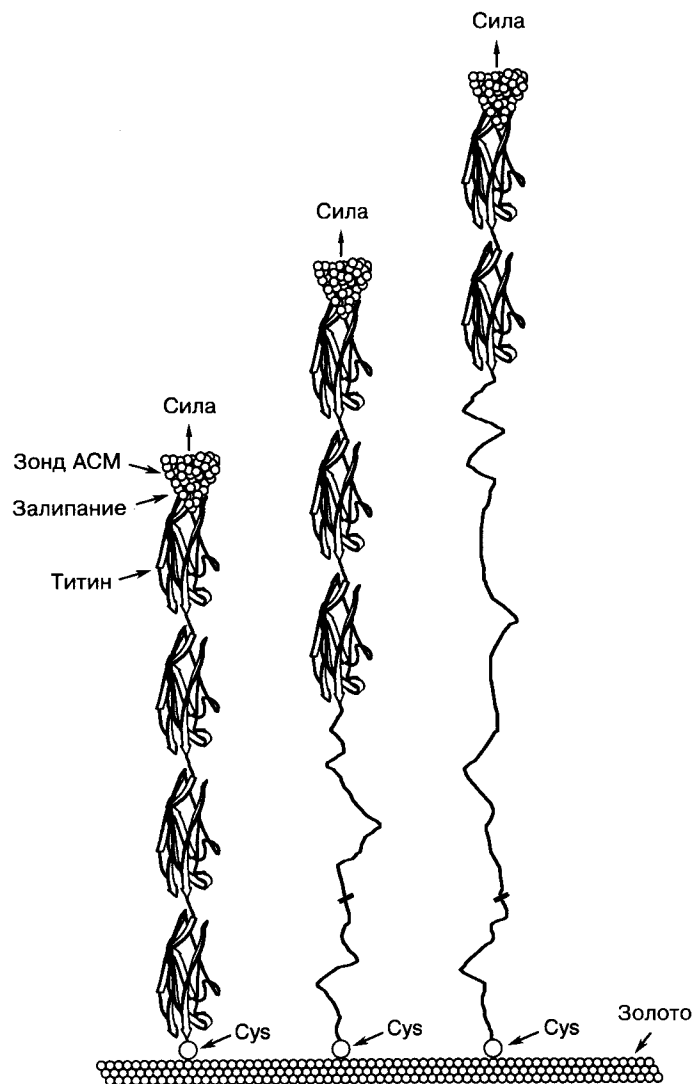


Рис. 8.2. Развертывание фрагмента титина с помощью АСМ (Carrion-Vasquez et al., 1999; Gaub, Fernandez, 1998). Белок прикреплен к поверхности золота через остаток цистеина. Для развертывания белка необходима сила в пределах от 100 до 300 пН (см. рис. 8.3).

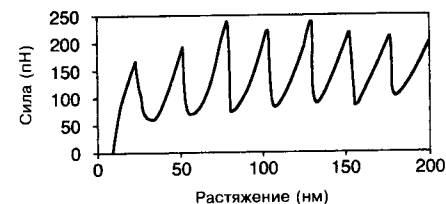


Рис. 8.3. Схематическое изображение кривой «сила-расстояние» для развертывания фрагмента титина с помощью АСМ (см. рис. 8.2). Пилообразная форма отражает развертывание индивидуальных доменов в соответствии с механизмом «все или ничего» (Carrion-Vasquez et al., 1999; Gaub, Fernandez, 1998).

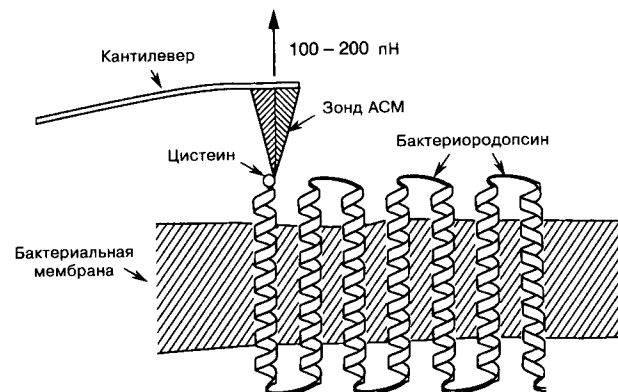


Рис. 8.4. Развертывание отдельных частей бактериородопсина. Чтобы удалить спираль бактериородопсина из бактериальной мембраны требуется сила в 100–200 пН (Oesterhelt et al., 2000).

мер модуля при разворачивании имеет размер около 14 нм, т. е. модули состоят из 38 аминокислотных остатков (Oroudjev et al., 2002). Адгезия между двумя смежными клеточными поверхностями у эукариота *Dictyostelium discoideum* включает дискретные взаимодействия, которые характеризуются силами отталкивания около 23 пН. Такие силы возникают возможно вследствие взаимодействия индивидуальных «контактных сайтов А» (csA) между молекулами гликопротеинов (рис. 8.5; Benoit et al., 2000).

Сила адгезии при присоединении рековерина (кальций-миристил-перекрывающего белка) к фосфолипидному бислою в присутствии ионов Ca^{2+} составляет 48 ± 5 пН (Desmeules et al., 2002). Одиночные молекулы *голо*-формы калмодулина (т. е. формы, нагруженной кальцием) требуют значительно больших сил при разворачивании с помощью острия АСМ, чем одиночные молекулы его *орто*-формы (Hertadi, Ikai, 2002). Одиночные молекулы гигантского нитевидного белка ти-

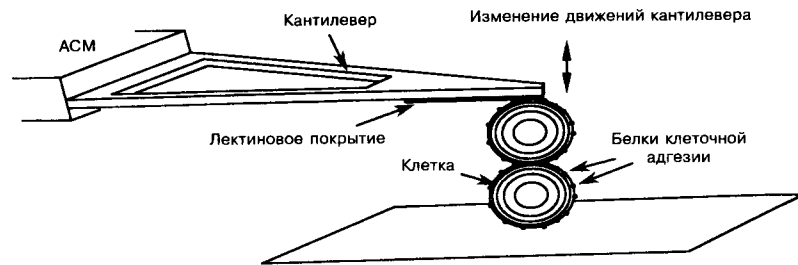


Рис. 8.5. Измерение дискретных взаимодействий при адгезии клеток. Легкое придавливание зондом вызывает прилипание одной клетки к лектиновому покрытию и ее адгезию со второй клеткой; затем зонд приподнимают до тех пор, пока не разорвутся силы между белками адгезии (Benoit et al., 1000).

тина проявляют механическую усталость, когда подвергаются повторным циклам натяжения-ослабления (Kellermayer et al., 2001). Дополнительные примеры исследования одиночных белковых молекул с помощью АСМ см. в разд. 7.1, 8.2 и 8.3.

8.2. Измерение сил в одиночном комплексе ДНК с ДНК-полимеразы

ДНК-полимераза катализирует репликацию ДНК. Для реакции репликации необходима одиночная цепь ДНК (онДНК) в качестве матрицы. В ходе этой реакции синтезируется цепь ДНК, комплементарная исходной одиночной цепи онсДНК. В процессе реакции полимеризации обе цепи обвиваются друг вокруг друга, что приводит к укорочению расстояния между концами ДНК. Удерживание цепи ДНК во время полимеризации может приостановить и даже обратить реакцию ее удлинения (рис. 8.6 и 8.7; Smith et al., 1996; Wuite et al., 2000).

Для измерения малых сил в одиночном комплексе ДНК с белком была использована оптическая ловушка: микробусина с присоединенной к ней ДНК удерживалась в определенном положении и приводилась в движение мощным лазерным лучом. Основным механизмом действия таких оптических щипчиков (пинцетов) заключается в следующем. Искривление световых лучей при прохождении сквозь преломляющую сферу сопровождается изменением количества движения света, что создает обратную силу воздействия на сферу. Когда сфера находится вне фокуса светового луча, эти силы отклонения света возвращают сферу обратно к фокусу. Другим механизмом является следующий. Когда изотропно рассеивающая бусина удаляется от фокуса, кинетическая энергия фотонов, рассеянных в направлении движения, увеличивается благодаря эффекту Доплера, который замедляет бусину. Чем больше интенсивность света, тем больше замедление движения. Таким образом, броуновское движение в сторону от фокуса оказывается энер-

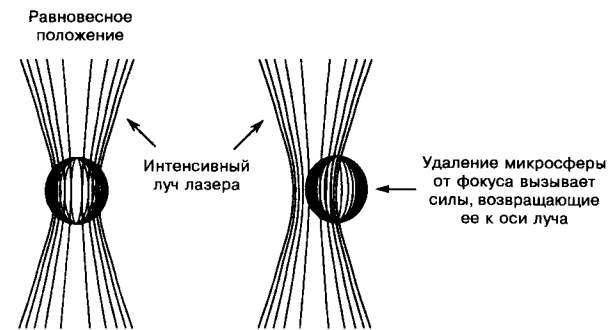
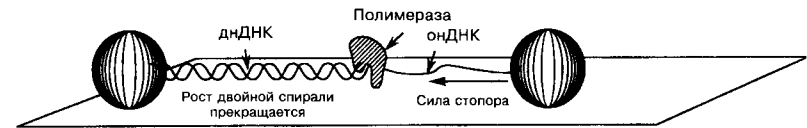


Рис. 8.6. Оптическая ловушка для измерения влияния натяжения ДНК-матрицы на активность ДНК-полимеразы фага T7 (рис. 8.7; Smith et al., 1996; Wuite et al., 2000).



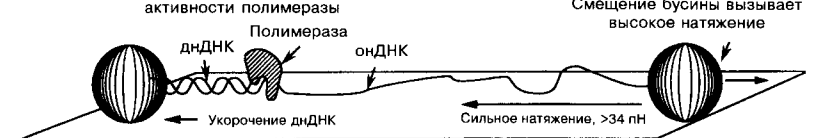
а

Натяжение возрастает вследствие укорочения ДНК за счет спирализации днДНК; полимеразы останавливаются при силе 34 пН



б

Если увеличить расстояние между бусинами, то двойная спираль укорачивается за счет экзонуклеазной активности полимеразы



в

Рис. 8.7. Измерение влияния натяжения ДНК-матрицы на активность ДНК-полимеразы фага T7 (Smith et al., 1996; Wuite et al., 2000).

гетически невыгодным по сравнению с движением в направлении к фокусу. Если использовать длину волны ниже максимума поглощения бусины, то сила улавливания увеличивается. Это происходит потому, что доплеровский сдвиг длины волны вызывает увеличение поглоще-

ния, и приобретенное таким образом дополнительное количество движения замедляет бусину.

Относительно разработки и применения техники оптических ловушек («щипчиков», «пинцетов») см. также основополагающие исследования механики единичных молекул с их использованием: Bustamante et al., 2000; Fliron et al., 197; Jeney et al., 2001; Liphardt et al., 2001; Pralle, Florin, 2002; Smith et al., 2001.

8.3. Молекулярное узнавание

С применением техники АСМ становятся возможными непосредственные измерения индивидуальных межмолекулярных взаимодействий (рис. 8.8—8.11; Dammer et al., 1995, 1996; De Paris et al., 2000; Florin et al., 1994; Fritz et al., 2000; Merkel et al., 1999; Prechtel et al.,

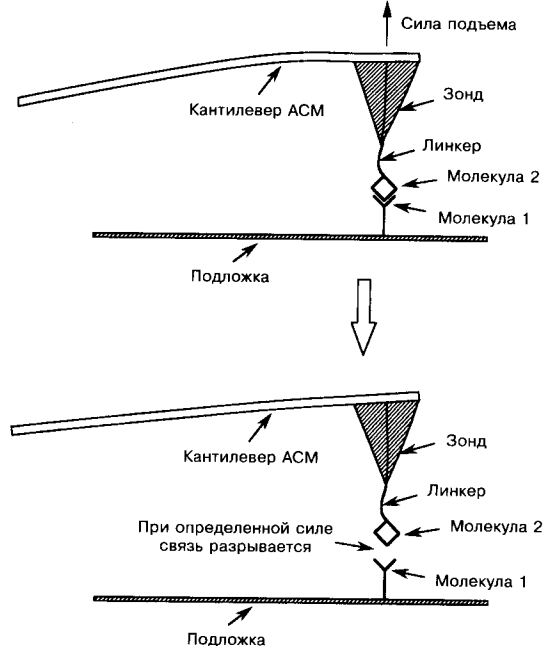


Рис. 8.8. Прямое измерение межмолекулярных взаимодействий с помощью АСМ. Одна из взаимодействующих молекул иммобилизована на поверхности подложки, другая соединена с зондом АСМ с помощью линкера. Зонд приводят в соприкосновение с этой поверхностью так, что между молекулами образуется специфическое взаимодействие. Поднятие кантилевера прерывает биофизическое взаимодействие. Сила взаимодействия определяется на основе анализа кривых «сила-расстояние» (De Paris et al., 2000; Schwesinger et al., 2000; см также разд. 7.1).

2002; Schwesinger et al., 2000; Strunz et al., 1999; Zochi, 2001; см. также разд. 7.1). С помощью техники, показанной на рис. 8.8, фактически можно измерить любые силы межмолекулярного взаимодействия, таких как, например, взаимодействие антиген-антитело.

На рис. 8.9 показан новый тип ДНК-сенсора, потенциально пригодный для обнаружения биологических загрязнений (Park et al., 2002; Service, 2002). Он основан на изменении электропроводности, которое происходит, когда с ДНК, присоединенной к наночастицам золота, взаимодействует целевая ДНК, иммобилизованная между двумя электродами. Проблематичным в таком методе обнаружения может

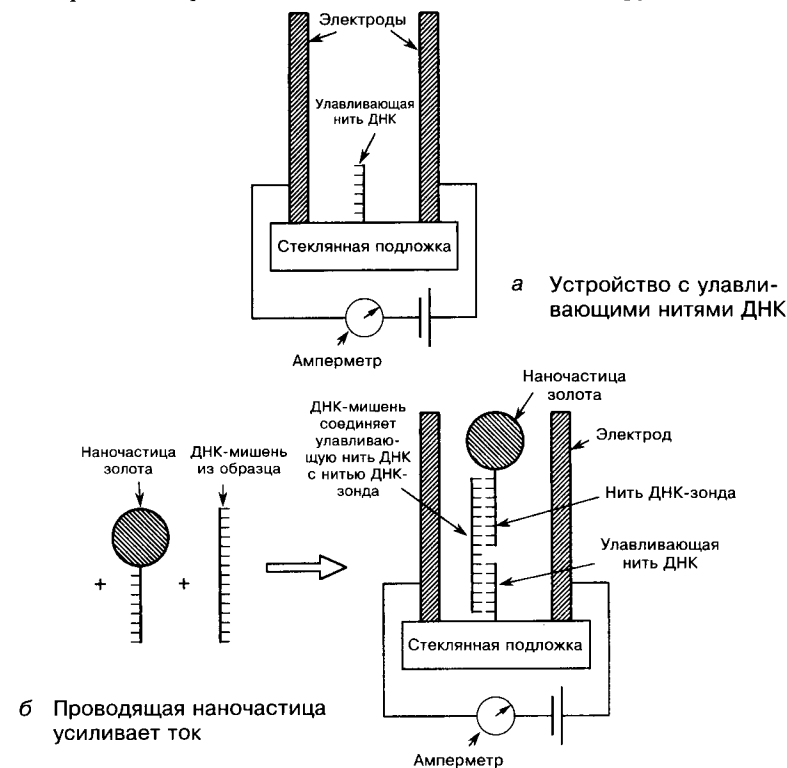


Рис. 8.9. Сенсор для обнаружения биологических агентов с использованием узнавания одиночных молекул ДНК (Demers et al., 2002; Park et al., 2002; service, 2002):

а — два электрода и улавливающая одонитевая молекула ДНК присоединены к стеклянному субстрату. Улавливающая ДНК комплементарна одному из концов ДНК агента; *б* — одонитевые ДНК-зонд и ДНК-мишень помещаются в камеру сенсора. Нить ДНК-зонда присоединена к наночастице золота и комплементарна другому концу ДНК-мишени. Когда все три нити ДНК гибридизуются друг с другом, наночастица золота удерживается между электродами, что регистрируется по увеличению тока.

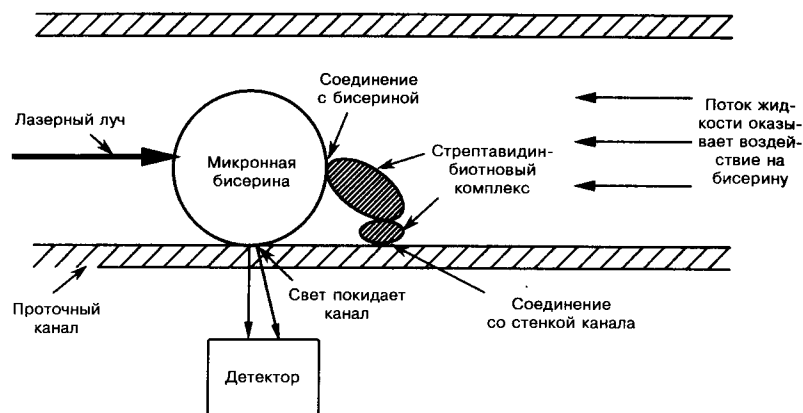


Рис. 8.10. Измерение силы контактов между одиночными молекулами с помощью микроскопии исчезающих волн (Zocchi, 2002). Движение микробисерены, присоединенной к стенке проточного канала посредством одиночного стрептавидин-биотинового комплекса, прослеживается посредством регистрации исчезающей волны, возникающей при воздействии потока жидкости. Такая техника позволяет производить прямое измерение сил разрыва связей в молекулярных комплексах.

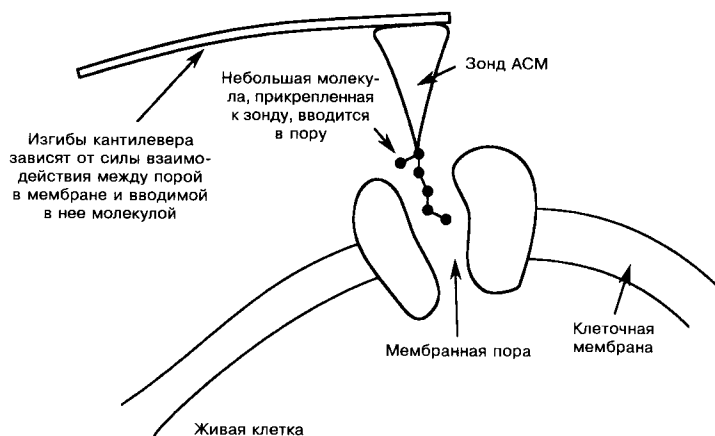


Рис. 8.11. Нанобиосенсор с использованием кантилевера АСМ (Pereira, 2001). Введение в живые клетки специфических молекул, включая лекарственные, или их возбуждение можно наблюдать в режиме реального времени и измерять силу взаимодействия.

оказаться трудность нахождения фрагментов ДНК, которые были бы уникальными для обнаруживаемого организма. В частности возможен определенный риск не обнаружить некоторые генетически модифицированные бактерии или вирусы.

8.4. Белковые наночипы и белковая инженерия

Ли и др. (Lee et al., 2002b) изготовили белковые наночипы методом нанолитографии (рис. 8.12 и 8.13). С помощью АСМ на подложку из тонкой золотой пленки наносят химический линкер, способный связывать белки, в виде рисунка из точек или решеток. Свободные участки поверхности инактивируют и затем к полученному рисунку из лин-

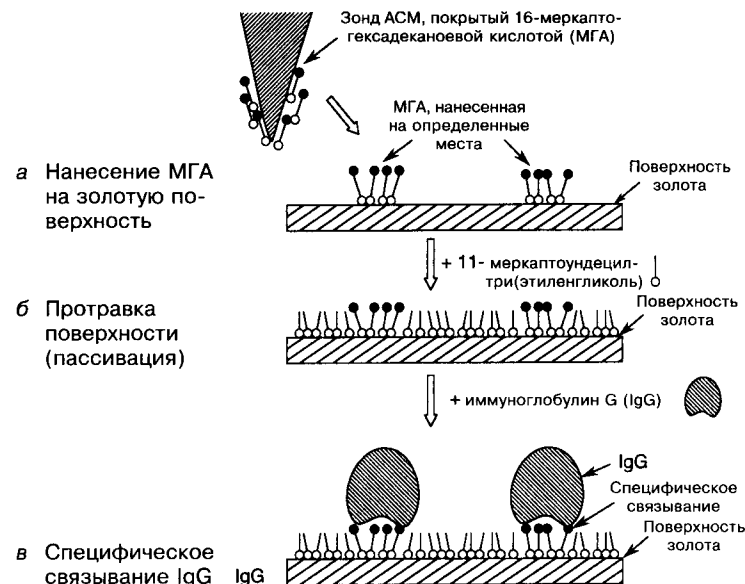


Рис. 8.12. Производство белковых наночипов для исследования молекулярных взаимодействий и других процессов узнавания (Hodneland et al., 2002; Lee et al., 2002b).

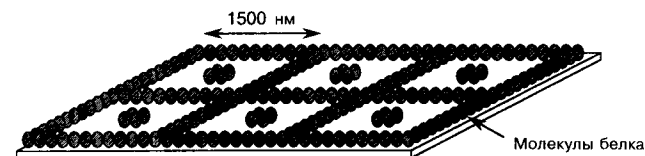


Рис. 8.13. Пример сконструированного белкового наночипа (Lee et al., 2002b). Матрица создана из белковых элементов размером от 100 до 350 нм с использованием нанолитографии (см. 8.12).

кера присоединяют белок. Другим методом производства белковых наноматриц является использование в качестве подложки германиевых пирамидок (рис. 8.14). Калво и др. (Calvo et al., 2002) сообщили об успешном молекулярном монтаже глюкозооксидазы в упорядоченные самособирающиеся наноструктуры. Подобный монтаж белковых молекул может оказаться полезным инструментом для грядущей Нанотехнологии (рис. 8.15 и 8.16). Другой попыткой, которая сможет найти

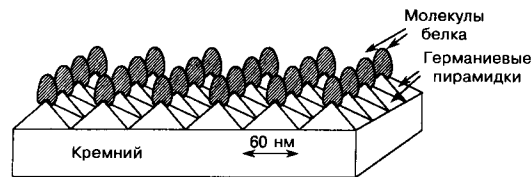


Рис. 8.14. Белковый наночип, созданный путем самосборки на нанометрового размера пирамидках кристаллов германия (Riedel et al., 2001). Динамические измерения контактных углов с помощью микрокапелек воды показало, что германиевый субстрат является высоко гидрофильным и таким образом пригоден для адсорбции гидрофильных белков. При этом, однако, наблюдается некоторая инактивация белка.

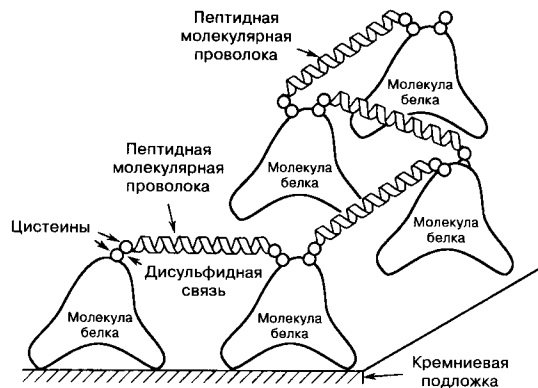


Рис. 8.15. Связанные «проволочками» белковые молекулы могут стать компонентами будущих нанотехнологических устройств (см. Calvo et al., 2002; Seeman, Belcher, 2002; Service, 2001). Такими проволочками могут быть химические соединения, пептиды, нанотрубки и т. п. Белки могут действовать в таких биоэлектрических структурах, как например, окислительно-восстановительные реле (Calvo et al., 2002).

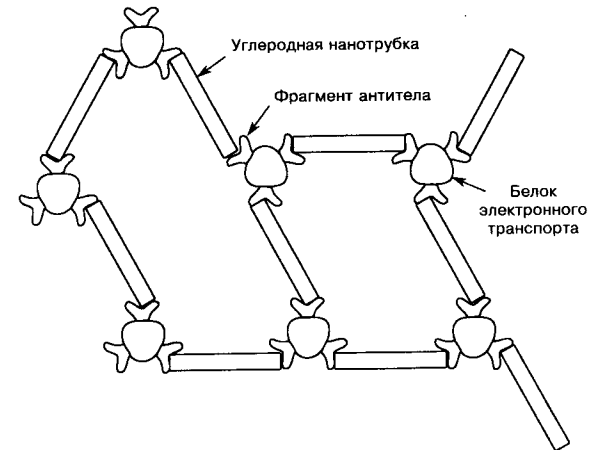


Рис. 8.16. Сетка из одностенных углеродных нанотрубок и генетически сконструированных белков для будущих нанотехнических устройств. Углеродные нанотрубки обладают исключительно низким сопротивлением и представляются исключительно полезными для производства проволочных наноперемычек (шунтов) и других наноструктур (см. Fagas et al., 2002; Odom et al., 2002).

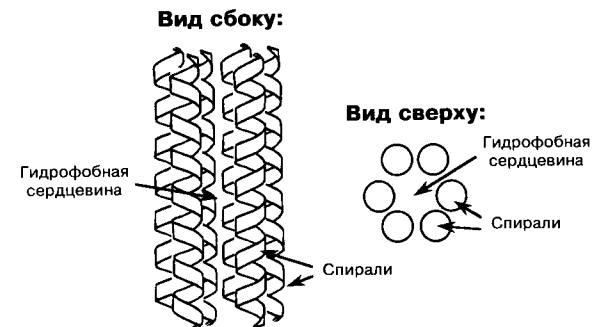


Рис. 8.17. Сконструированные гексамерные спиральные втулки (Ghirlanda et al., 2002). Чтобы установить требования для стабилизации гексамера, авторы систематически варьировали полярность и пространственный объем остатков в сердцевине гексамера. Образование гексамерной структуры лучше всего стабилизировалось путем замены трех полярных остатков на гидрофобные остатки (два фенилаланина и один триптофан).

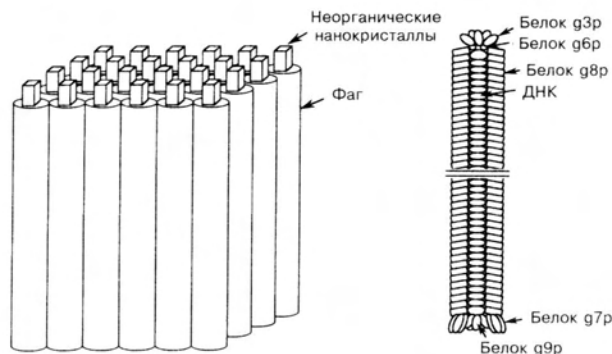


Рис. 8.18. Слева: упорядочение неорганических нанокристаллов с использованием генетически сконструированных фагов (Lee et al., 2002c). Бактериофаги создают основу для самоупорядочивающихся систем. Генетическая инженерия позволяет получать фаги, специфически связывающиеся с нанокристаллами. Справа: структура фага.

применение в нанотехнологии, является конструирование ненативных макромолекулярных ансамблей, таких, например, как гексамерные спиральные втулки (рис. 8.17; Ghirlanda et al., 2002). Наконец, рис. 8.18 показывает производство упорядоченных неорганических нанокристаллов на вершине матрицы, составленной из генетически сконструированных вирусов (Lee et al., 2002c).

8.5. Изучение и манипуляции с растущими кристаллами белков

Производство кристаллов белков и вирусов с надлежащей способностью к дифракции часто является основным препятствием для достижения высокого разрешения при их рентгеноструктурных исследованиях (см. разд. 4.1). АСМ оказывается исключительно полезным для изучения и манипулирования ростом кристаллов (рис. 8.19; Biscarini et al., 2002; Durbin, Carlson, 1992; Durbin et al., 1993; Malkin et al., 1995; McPherson et al., 2000; Mollica et al., 2001). Рост большинства белковых и вирусных кристаллов является процессом двухмерной нуклеации, который осуществляется путем образования новых слоев кристалла (McPherson et al., 2000). Скобление поверхности кристалла лизоцима, полностью покрытого загрязнением, которое останавливает рост кристалла, приводит к возобновлению его роста (McPherson et al., 2000).

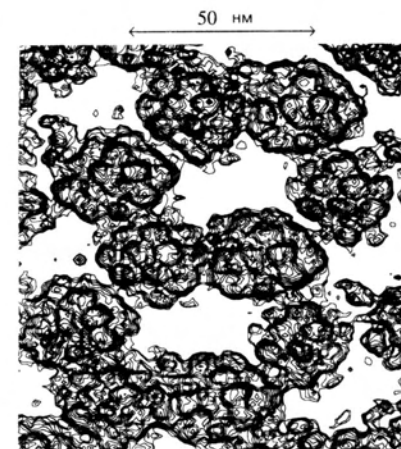


Рис. 8.19. Изображение поверхности кристалла вируса желтой мозаики турнепа, полученное с помощью АСМ (Kuznetsov et al., 2000; Malkin et al., 1995, 2002; McPherson et al., 2000, 2001). Исследование с помощью АСМ позволяет выявить источники неупорядоченности в кристалле и механизм их образования.

8.6. Нанотрубки, молекулярные диоды, самоорганизующиеся нанотранзисторы, трансфекция наночастицами и прочие биофизические нанотехнологии

Если клетки кости раздражить прикосновениями острия АСМ, то в них активируются специфические ионные каналы, реагирующие на механическое воздействие (Charra, Horton, 2002). С помощью острия АСМ можно рассекать слои бактериальной поверхности, и это позволяет лучше понять высокую стабильность этой защитной оболочки бактерий (рис. 8.20; Scheuring et al., 2002). Показано, что тонкоизмельченные частицы салбутамола прилипают к стеклу прочнее, чем к политетрафторэтилену (Eve et al., 2002). Другие нанотехнологические новинки показаны на рис. 8.21—8.27 и в разд. 7.1.

Нанопипетка, показанная на рис. 8.22, предназначена для контролируемой доставки макромолекул в живые клетки (Ying et al., 2002). Под действием напряжения, приложенного к нанопипетке, молекулы ДНК медленно перемещаются к кончику пипетки. Поскольку, вследствие конической геометрии нанопипетки, основное падение напряжения происходит в районе кончика, молекулы ДНК, как только они достигли кончика, быстро доставляются в клетку. Если одновременно

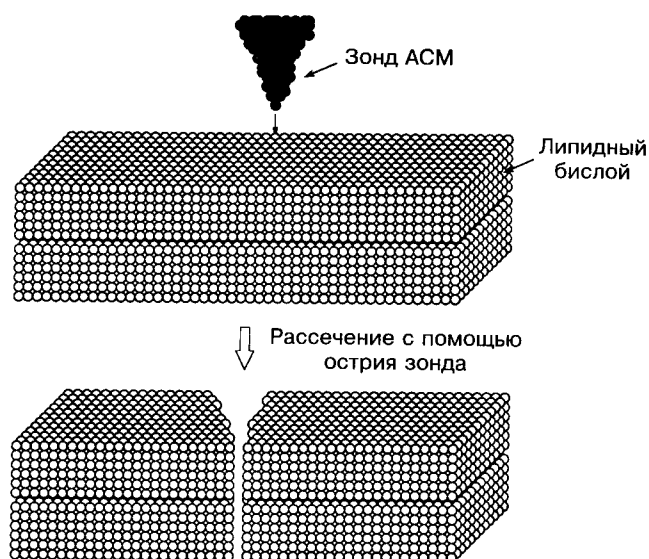


Рис. 8.20. Расщепление нативного двойного липидного слоя бактерий, адсорбированного на слюде (не показана), с помощью зонда АСМ (Scheuring et al., 2002). Используя острие зонда АСМ как нанорассекатель, можно разрезать поверхностные слои и изучать их механические и защитные свойства.

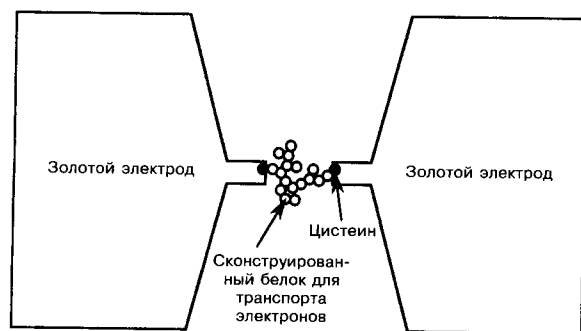


Рис. 8.21. Проводимость между нанoeлектродами, соединенными мостиком из одиночной молекулы (Reimers et al., 2002) или несколькими органическими молекулами, образующими нанокристалл (Rinaldi et al., 2002). В некоторых случаях такая система может работать как выпрямитель, например, с нанокристаллами дезоксигуанина (Rinaldi et al., 2002).

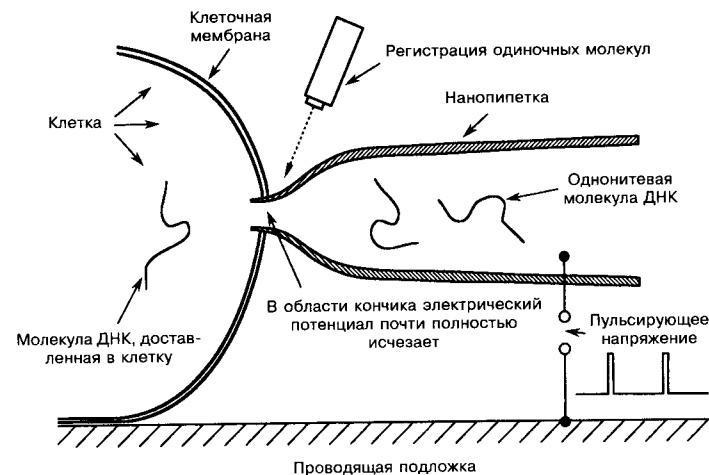


Рис. 8.22. Программируемая доставка ДНК сквозь нанопипетку (Bruckbauer et al., 2002b; Ying et al., 2002). Коническая геометрия пипетки вызывает резкое падение электрического потенциала в области ее кончика. Контролируя прикладываемое пульсирующее напряжение, можно достичь строго дозированной доставки молекул ДНК.

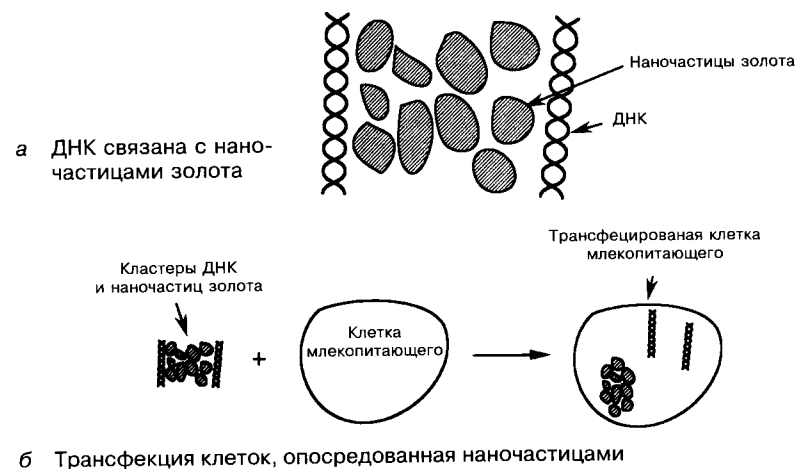


Рис. 8.23. Трансфекция клеток с помощью наночастиц золота (Sandhu et al., 2002):

а — наночастицы золота активированы монослоем соединения, содержащего четвертично-амониевые функциональные группы, к которым присоединена ДНК; *б* — схема процесса трансфекции.

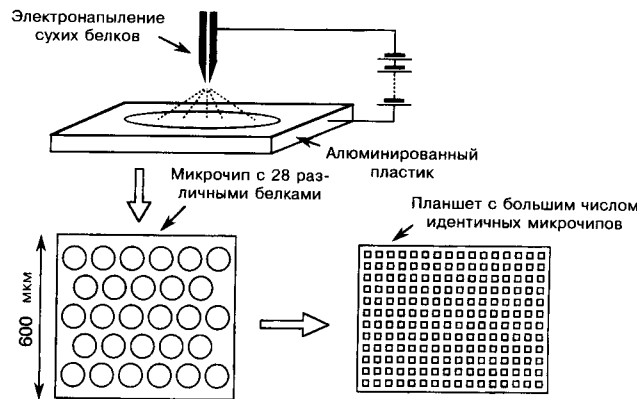


Рис. 8.24. Изготовление микро- и наночипов путем электронного испарения сухих белков (Avseenko et al., 2002, 2002). С помощью таких чипов можно определять антитела в образцах плазмы крови мышей, которые иммунизированы белками, использованными для приготовления чипов.

применять методы обнаружения отдельных молекул, то удастся строго контролировать доставку в живую клетку одной-единственной молекулы ДНК.

Рис. 8.25 иллюстрирует технику для быстрого получения полимерных наночастиц, содержащих белки. Раствор полимера и белка аккуратно смешивают с солевым раствором. Эффект последующего высаливания стимулирует самоорганизацию наночастиц, которые имеют поверхностные свойства, отличные от свойств нативного белка (Davda, Labhasetwar, 2002; Haas, Lehr, 2002; Igatua et al., 2002; Konan et al., 2002; Prokop et al., 2001). Подобным образом можно упаковать в липиды и молекулы

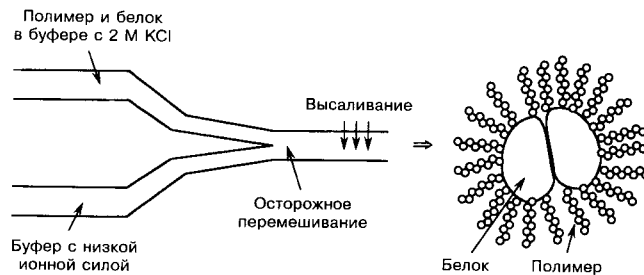


Рис. 8.25. Непрерывно-проточное изготовление наночастиц размером 100 нм для доставки лекарств, белков и для генной терапии (Davda, Labhasetwar, 2002; Haas, Lehr, 2002; Igatua et al., 2002; konan et al., 2002; Prokop et al., 2001).

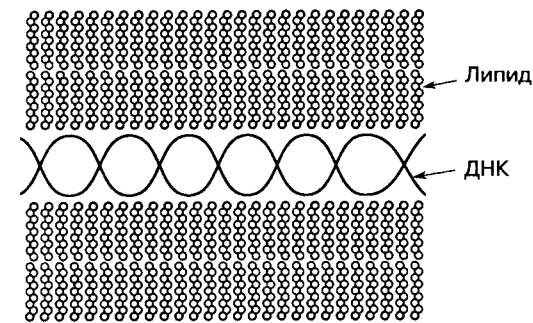


Рис. 8.26. Сконструированная *de novo* вирусоподобная частица для доставки лекарств, белков и для генной терапии (Xu et al., 2002). В противоположность белковым оболочкам большинства вирусов оболочка этих частиц составлена из липидов.

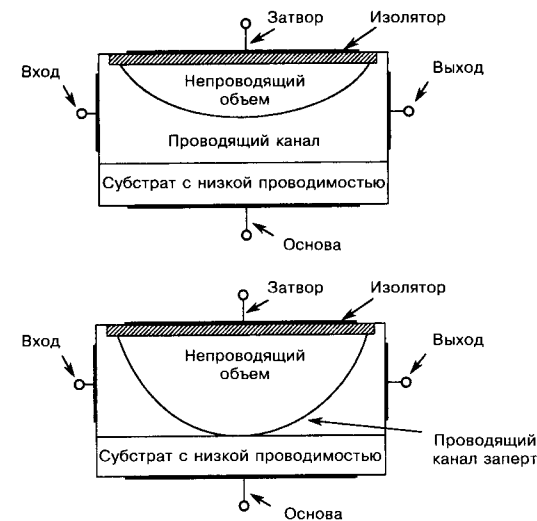


Рис. 8.27. Самосборный монослойный полевой транзистор (Schön et al., 2001a,b). На рисунке представлен возможный принцип работы такого полевого транзистора. Проводимость между входом и выходом контролируется через затвор, который электрически изолирован от самого устройства. Ширина проводящего канала между входом и выходом варьируется путем изменения напряжения между затвором и основанием:
 а — открытый канал между входом и выходом: ток может протекать между ними; б — канал закрывается наложением напряжения между затвором и основанием: теперь вход и выход изолированы друг от друга.

ДНК (рис. 8.26; Xu et al., 2002). Некоторые из таких частиц способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и рассматриваются как многообещающие кандидаты для будущей генной терапии и прицельной доставки лекарств.

С использованием самосборных органических молекул был создан полевой транзистор (Schön et al., 2001a,b). Принцип действия такого полевого транзистора показан на рис. 8.27.

Добавленная литература

1. Крылов А. Биологические микрочипы: будущее медицины. http://bio.fizteh.ru/abiturs/bio_chip.html.
2. Пул Ч.П. мл., Оуэнс Ф.Дж. Нанотехнологии. — М.: Техносфера, 2004, Российский химический журнал. Том XLVI (2002) № 5: Перспективы нанотехнологии.
3. Харрис П. Углеродные нанотрубы и родственные структуры. Новые материалы XXI века. М.: Техносфера, 2004. — 400 с.

Нанотехнологии в Интернете:

1. Сайт автора: http://www.pitb.de/nolting/biophysics_methods/nanobiotech.html.
2. Наномир: <http://www.nanoworld.org>.
<http://www.ixs.nm.ru/nan.htm>.
<http://www.nanotechnology.bessmertie.ru/sta.nan.shtml>.
<http://www.foresight.org/EOC>.
<http://www.nanonewsnet.ru>.
<http://www.nanotube.ru>.
Устройства и материалы для нанотехнологии <http://ru.ntmdt.ru>.
Сайт по ДНК-чипам: <http://dna.pynny.ru/russian/main.html>.

ГЛАВА 9

ПРОТЕОМИКА: ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ

В настоящее время в масштабе целых геномов предпринимаются серьезные попытки картировать взаимодействие белков с лекарственными соединениями, выявлять белковые мишени, на которые направлено их действие (разд. 9.1.), картировать белок-белковые взаимодействия (разд. 9.2), выявлять химическую активность белков (разд. 9.3) и устанавливать их структуру (разд. 9.5). Это направление исследований, называемое *геномикой*, существенно расширяет наши возможности познания биологии организмов далеко за пределы уровня первичных последовательностей (см. Adam et al., 2002b; Burbau, Tobal, 2002; Christendat et al., 2000; Figeys, 2002a,c; Gallardo et al., 2002; Hubbard, 2002; Kersten et al., 2002; Koshland, Hamadani, 2002; Lin, Corhish, 2002; Liu et al., 2002; Morrison et al., 2002; Natsume et al., 2002; Yarmush, Jayaraman, 2002). В широкомасштабных исследованиях белков и взаимодействующих с ними небелковых компонентов используются технологии микрочипов (см. Gera et al., 2002; Kukar et al., 2002; MacBeath, 2002; Talapatra et al., 2002) и методы биоинформатики (см. Bork, 2002).

Основанные на протеомике подходы к исследованию органоспецифичной регуляции и сигнальных каскадов рассматриваются как ключевые для лучшего понимания болезней и терапии (см. Jäger et al. 2002). С помощью протеомики изыскивают новые антигены, пригодные для создания вакцин (Klade, 2002; Nilsson, 2002; Vytyska et al., 2002). Идентификация индивидуальных белков, которые аномально экспрессируются в опухолях, приобретает большое значение для диагностики, прогнозирования и лечения рака (Celis et al., 2002; Dwek, Rawlings, 2002; Jain, 2002; Michener et al., 2002; Zheng et al., 2003). Протеомный анализ трансгенных мышей с нейродегенеративными заболеваниями выявил в их мозгу 34 белка с значительно измененной интенсивностью экспрессии (Tilleman et al., 2002). Протеомный подход был успешно использован для идентификации продуктов трансляции в синапсоммах зрительной доли мозга кальмара (Jimenez et al., 2002). Ожидается, что создание протеомной базы данных для центральной нервной системы (ЦНС) человека ускорит подбор более специфичных маркеров для диагностики и прогнозирования болезней, а также новых избирательных лекарств для лечения нарушений ЦНС (Rohlf, Southan, 2002). Протеомика становится исключительно мощным инструментом для изучения возрастных изме-

нений в экспрессии белков у человека и для понимания изменений, которые происходят при старении (Cobon et al., 2002).

Усовершенствования, применяемые для повышения пропускной способности и удешевления методов протеомики, включают в себя новейшие достижения масс-спектрометрии (разд. 9.1 и 9.2), ДНК-микрочипы (разд. 9.1), белковые микрочипы (разд. 9.2), генетические гибридные системы (разд. 9.2) и технологию «лаборатория на чипе» (lab-on-a-chip) (разд. 9.4).

9.1. Обнаружение мишеней

Двухмерный электрофорез и масс-спектрометрия (рис. 91.) широко используются для изучения состава белков и изменения их содержания у человека, животных и растений. Важными применениями являются:

- а) идентификация биомаркеров, специфичных для данного типа клеток, болезненных состояний, процесса старения;
- б) изучение изменений в составе белков в ответ на действие лекарственных средств.

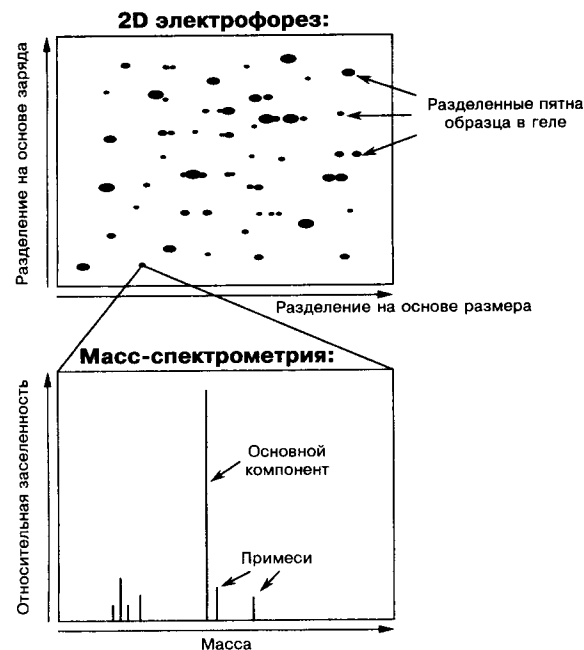


Рис. 9.1. Обнаружение белков, существенных для некоторых болезней, с помощью двухмерного полиакриламидного гель-электрофореза и масс-спектрометрии (см. Blomberg, 2002; Edwards et al., 2000; Kersten et al., 2002; Man et al., 2002; Mo, Karger, 2002; Rohlf, Southan, 2002).

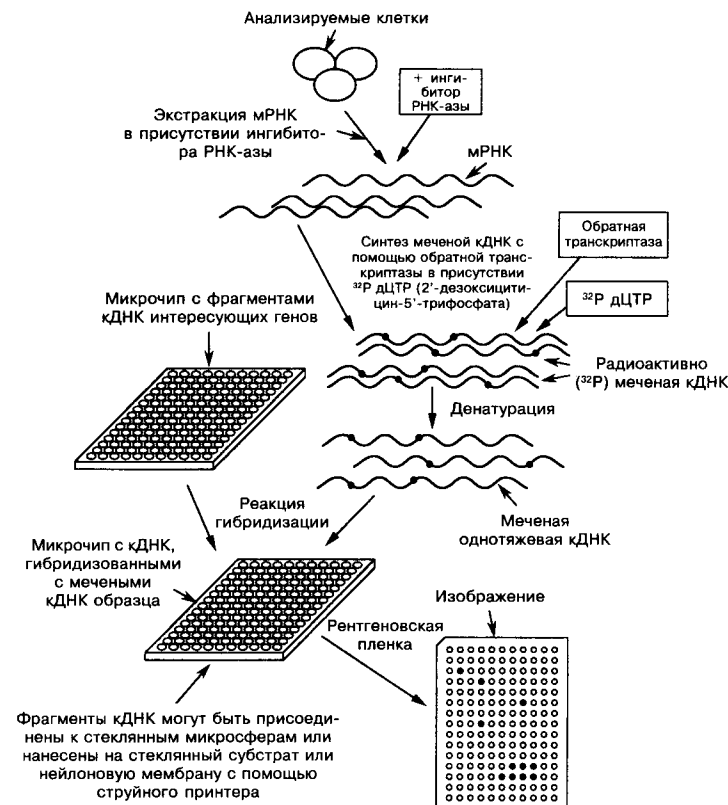


Рис. 9.2. Обнаружение белков, существенных для некоторых болезней, например маркеров рака, с помощью технологии микрочипов (см. SuperArray, Inc., Bethesda, VD). В данном методе выявляются различия в населенности мРНК, определяемых как кДНК (комплементарная ДНК). Обычно чипы с кДНК с размером пятнышек 10–500 мкм на стеклянных или нейлоновых субстратах изготавливаются с помощью высокоскоростных роботов или струйных принтеров. Каждое пятно содержит иммобилизованные зонды, которые представляют собой фрагменты кДНК различной длины (100–10 000 п. о.), комплементарные кДНК-мишеням. Радиоактивно меченные кДНК-мишени синтезируют с помощью обратной транскриптазы на основе мРНК из анализируемых клеток. Однотитровые кДНК-мишени гибридизуются с комплементарными кДНК на матрице, а несвязавшиеся кДНК вымываются буферным раствором. Анализ расположения радиоактивных пятен на рентгеновской фотопленке показывает, какая мРНК присутствует в анализируемых клетках и, следовательно, какие белки в них экспрессируются.

Многообещающим представляется использование высокопроизводительной техники микрочипов для обнаружения белков, связанных с болезнями (рис. 9.2).

9.2. Протеомный анализ молекулярных взаимодействий

Анализ нескольких сотен тысяч белок-белковых взаимодействий, который стал реальным с использованием высокопроизводительной тех-

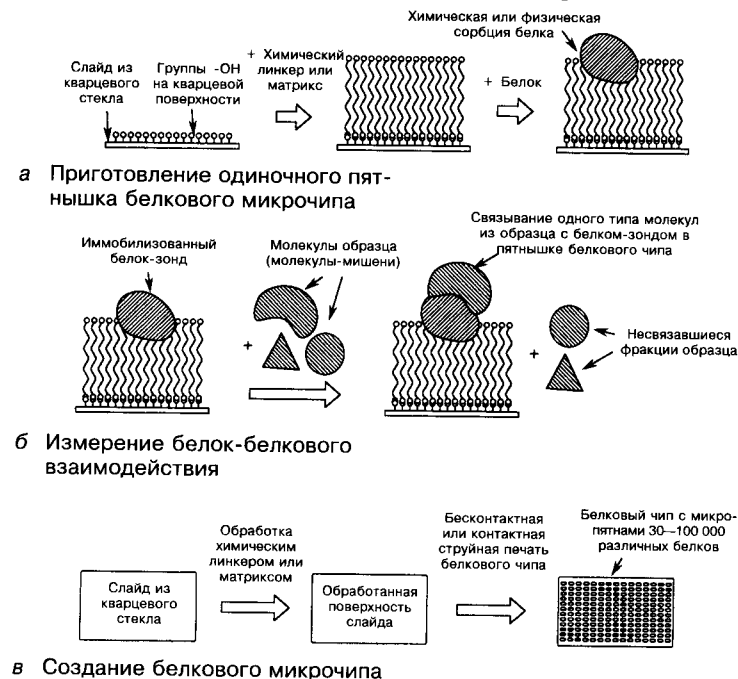


Рис. 9.3. *а* — создание микрочипа для анализа белок-белковых взаимодействий (см. Grayhack, Phizicky, 2001; MicroSurfaces, Inc., Minneapolis, MN). Для сохранения структурной целостности белок иммобилизован на матриксе или слое таких химических линкеров, которые обеспечивают нативно-подобное окружение для внедренных в них белковых молекул; *б* — молекулы анализируемого белка (молекулы-мишени) взаимодействуют с молекулой-зондом в пятнышке чипа. Несвязавшиеся белки образца просто вымываются буферным раствором. Молекулы образца метятся радиоактивно или люминесцентно, что позволяет регистрировать связывание целевого белка с белковой молекулой-зондом; *в* — создание чипа с 30–100 000 индивидуальных белков-зондов, иммобилизованных на кварцевом слайде, путем химической обработки его поверхности и струйно-принтерного нанесения белковых пятнышек.

нологии микрочипов (рис. 9.3) и дрожжевой дигибридной системы (рис. 9.4), привел к открытию десятков принципиально важных межмолекулярных взаимодействий (см. Ito et al., 2002; McCraith et al., 2000; Stagljaj, Fields, 2002).

Рис. 9.5 и 9.6 показывают, как можно с помощью одной лишь масс-спектрометрии, без двухмерной хроматографии или электрофореза, анализировать большое число белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий, соответственно. Возможные неоднозначности при иденти-

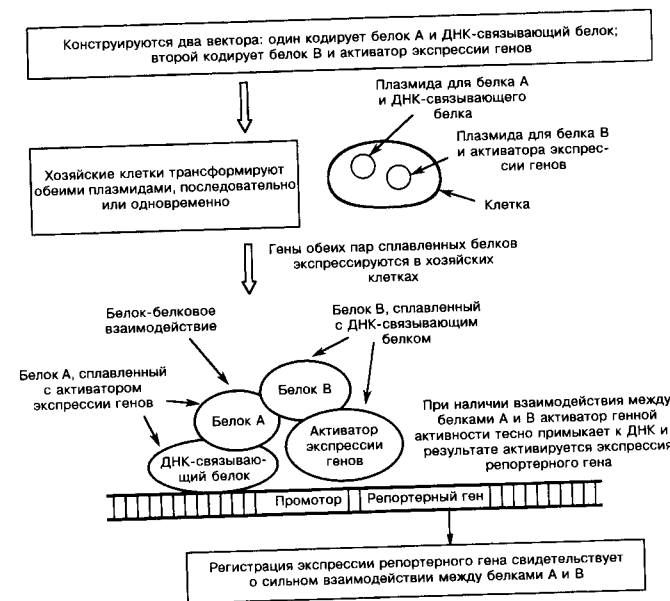


Рис. 9.4. Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью дрожжевой дигибридной системы (McCraith et al., 2000; Ito et al., 2002; Stagljaj, Fields, 2002). Конструируют два вектора. Один вектор содержит код (кодирующую нуклеотидную последовательность) для белка с предсказанной открытой рамкой считывания — белок А), сопряженный с кодом для ДНК-связывающего белка. Второй вектор содержит код для другого белка с другой предсказанной открытой рамкой считывания (белок В), сопряженный с кодом для активатора экспрессии генов. При одновременной экспрессии обоих векторов в клетке белок А оказывается связанным с ДНК. А белок В оказывается активируемым. В результате оба сплавленных белка производят в действие экспрессию активатора в непосредственной близости от ДНК. Это приводит к активации репортерного гена. Регистрируемая у диплоидов экспрессия репортерного гена в такой дигибридной системе свидетельствует о сильном взаимодействии белков А и В.

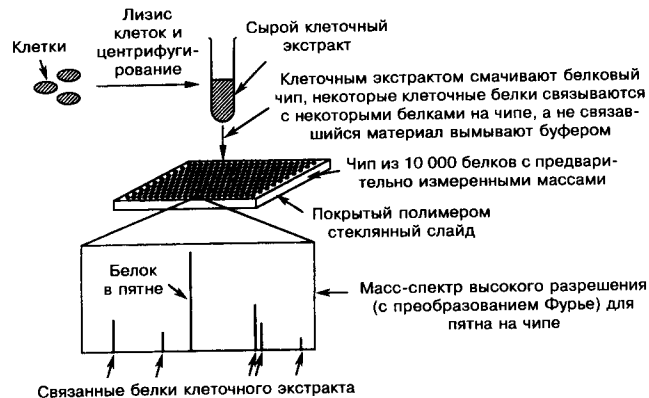


Рис. 9.5. Анализ миллионов белок-белковых взаимодействий в одном организме без двухмерной хроматографии или электрофореза. Белки-мишени, иммобилизованные на микрочипе, взаимодействуют одновременно со всеми белками, экспрессированными в клетках определенного типа. После удаления несвязанных молекул для каждого пятна на микрочипе записывается масс-спектрограмма. Каждая масс-спектрограмма показывает пик, соответствующий белку-мишени, а возможно и другие пики, соответствующие связывающим белкам. Связывающие белки затем идентифицируют по их массам.

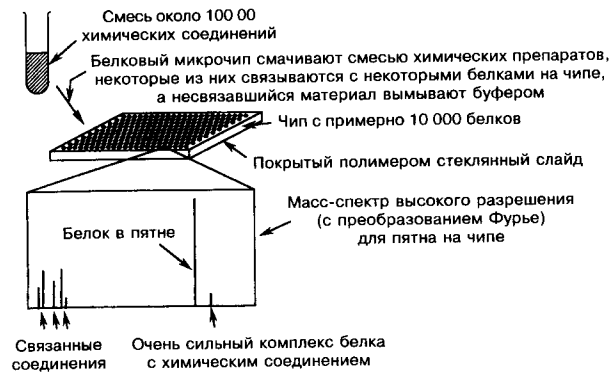


Рис. 9.6. Крупномасштабный анализ взаимодействий химических соединений с белками без двухмерной хроматографии или электрофореза. Белковый чип погружают в смесь химических препаратов. Спустя некоторое время несвязавшиеся химические соединения вымывают буферным раствором. Затем пятна анализируют масс-спектрометрически. Так как массы белков и реагентов измерены заранее, связывание химических соединений можно легко идентифицировать.

кации пиков масс могут быть устранены с помощью техники ионной фрагментации (см. рис. 3.27). Открытие новых мишеней для биологически активных соединений является исключительно важным при разработке новых лекарств (см. Pillutla et al., 2002; Whitelegge, la Coutre, 2002).

Масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет картировать большое число белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий, даже без использования микрочипов (рис. 9.7). Быстрая размерно-эксклюзионная хроматография (разд. 2.2) позволяет разделять на фракции сложнейшие смеси взаимодействующих молекул. Для этого параметры разделения подбирают таким образом, чтобы комплексы сильно взаимодействующих молекул не разрушались в процессе хроматографии.

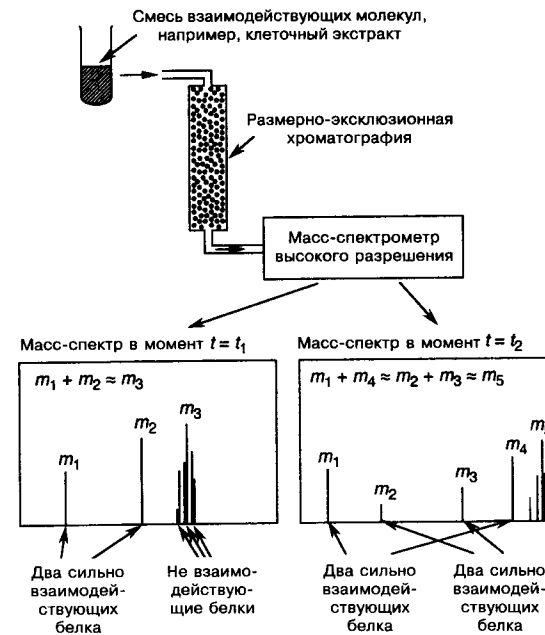


Рис. 9.7. Прямое определение сильных белок-белковых взаимодействий в клеточном экстракте без необходимости создавать чипы. Сперва смесь мономерных белков и белок-белковых комплексов разделяется по размеру с помощью гель-хроматографии. Условия для хроматографии выбирают такими, чтобы прочные комплексы диссоциировали бы не полностью. Затем поводят масс-спектрометрию каждой хроматографической фракции и идентифицируют димерные комплексы и их две взаимодействующие макромолекулы во фракции. Во время ионизации в масс-спектрометре комплексы диссоциируют, вызывая появление двух пиков в масс-спектре. Эти двоянные пики идентифицируют по их общей массе, которая примерно равна сумме масс несвязанных молекул. Аналогичным образом такой метод можно применять для картирования и других сильных макромолекулярных взаимодействий.

Выделенные фракции затем подвергают масс-спектрометрическому анализу. Сильно взаимодействующие димеры молекул проявляются в спектрограмме как пары с общей массой, примерно равной сумме масс мономеров в данной фракции.

9.3. Химическая протеомика

Химическая протеомика заключается в том, чтобы для тысяч идентифицированных или предсказанных генных продуктов установить их

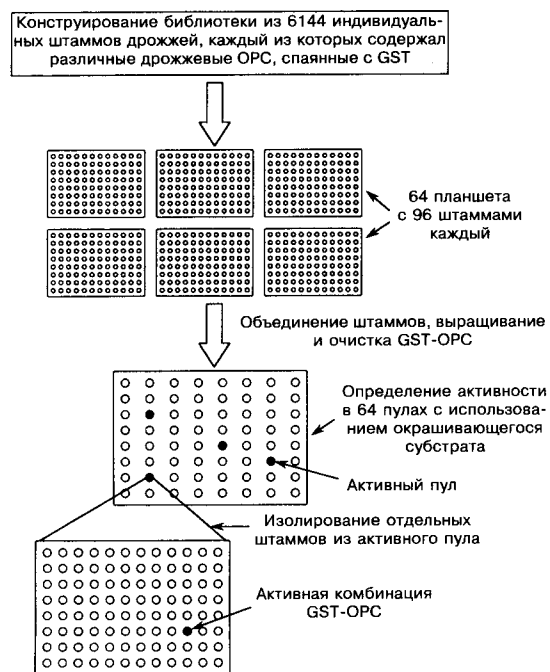


Рис. 9.8. Пример химической протеомики (Grayhack, Phizicky, 2001; Martzen et al., 1999; Phizicky, 2002). Использована библиотека 6144 генетически-сконструированных штаммов дрожжей. Каждый штамм экспрессирует уникальную дрожжевую открытую рамку считывания (OPC) в виде слияния GST-OPC (GST — глутатион S-трансфераза). Штаммы объединяли в группы (пулы) по 96 в каждой и в таком пуле определяли биохимическую активность фермента. Из тех пулов, в которых наблюдалась активность GST, изолировали и идентифицировали индивидуальные штаммы, в которых за активность были ответственны GST-OPC. Таким путем было открыто несколько неизвестных ранее биохимически активных генных продуктов.

молекулярные или клеточные функции. Выявление активностей среди больших пулов сконструированных штаммов с последующим выделением активных пулов является эффективным методом открытия новых функций генов (рис. 9.8; см. Adam et al., 2002a; Grayhack, Phizicky, 2001; Martzen et al., 1999; Phizicky et al., 2002).

9.4. Технология «лаборатории на чипе» и масс-спектрометрические сканеры

Белковые и ДНК-микрочипы все чаще и чаще обрабатываются с помощью новейшей технологии «лаборатория на чипе» (рис. 9.9 и 9.10). Стеклоплатинки с выгравированными в них тончайшими ка-

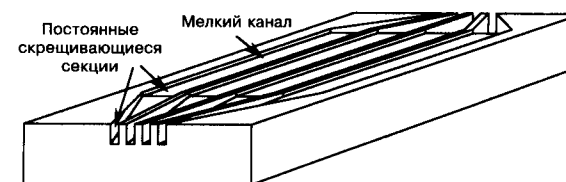


Рис. 9.9. Упрощенная схема технологии «лаборатория на чипе» (см. Cheng et al., 2002; Figeys, 2002b; Laurell, Marko-Varga, 2002; Swedberg, Brennen, 2001; Swedberg et al., 1996). Тонкие микроканалы в подложке либо процарапывают, либо протравливают и накрывают другой пластиной (не показано). Одиночный чип может содержать все каналы, переключатели и резервуары, необходимые для многостадийных химических реакций.

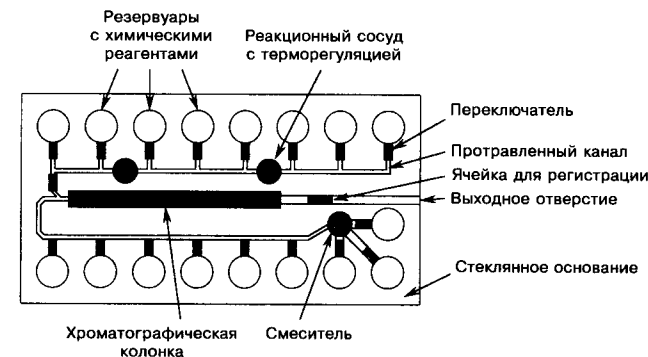


Рис. 9.10. Пример технологии «лаборатория на чипе». Каналы протравляются в стеклянной подложке.

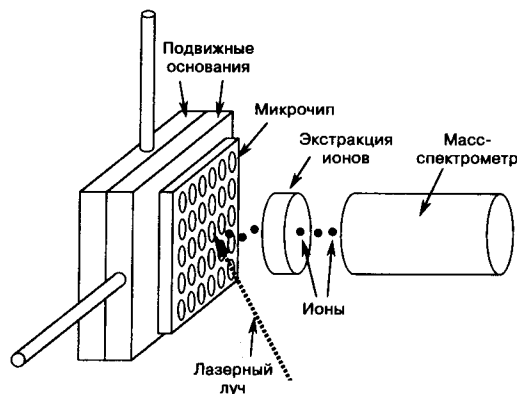


Рис. 9.11. Масс-спектрометрический сканер для автоматических измерений белковых и ДНК-микрочипов. Шаговый двигатель быстро перемещает микрочип в требуемое положение. Масс-спектр для каждого пятна получается и анализируется автоматически. Такой сканер может применяться в различных методах, таких как, например, показанные на рис. 9.5 и 9.6.

навками, микропереключатели, микросмесители и другие миниатюрные приспособления работают как маленькие фабрики.

Чтобы просканировать белковые или ДНК-матрицы с помощью люминесцентных детекторов, образец обычно должен быть помечен специальными метками. И это может стать источником ошибок вследствие ограниченной чувствительности и неспецифического связывания. Более важно, что смесь сигналов удастся разделить далеко не всегда. Поэтому автоматическое масс-спектрометрическое обнаружение молекул в пятнышках на микрочипе может существенно повысить качество получаемой информации (рис. 9.11).

9.5. Структурная протеомика

Протеомика становится мощной движущей силой для широкомасштабного предсказания и определения структуры белков (см. Renfrey, Featherstone, 2002; Schmid, 2002). Определение структуры с высоким разрешением все еще остается прерогативой рентгеновской кристаллографии и ЯМР (ядерного магнитного резонанса). Поскольку оба метода являются дорогими и трудоемкими, продолжают интенсивные работы по их оптимизации. Теперь, например, наблюдаемые пики ЯМР можно автоматически приписывать конкретным аминокислотным остаткам (Heinemann et al., 2001; Nilges et al., 1997). Крупномасштабные методы ЯМР и кристаллографии разрабатывает, например, Фирма BPSF (Berlin Protein Structure Fabric) (Boetner et al., 2002; Heinemann et al., 2000, 2001).

Добавленная литература

1. Арчаков А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика — науки о жизни XXI столетия. Вопросы медицинской химии, № 1, 2000.
2. Арчаков А.И. Что за геномикой? — Протеомика. Вопросы медицинской химии, № 1, 2000.

Протеомика в Интернете:

<http://www.gcms.ru/lcline/proteomics/proteomics.html>.

Статья «Протеомика»: <http://www.textronica.com/lcline/proteomics/proteomics.html>.

Сайт по ДНК-чипам: <http://dna.pynny.ru/russian/main.html>.

ГЛАВА 10

СПЕКТРОМЕТРИЯ ИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ

10.1. Основная конструкция спектрометров

Спектрометрия ионной подвижности была разработана как простой и недорогой метод обнаружения и определения свойств органических соединений (Ashbury, Hill, 2000; Baumbach, Eiceman, 1999; Baumbach, Stach, 1998; Beegle et al., 2001; Burke, 1992; Campbell et al., 1991; Carroll, 1972; Carroll et al., 1971; Cohen, Crowe, 1973; Cohen, Karasek, 1970; Cohen et al., 1972; Eiceman et al., 2001; Eiceman, Karas, 1994; Karasek, 1970; Matz, Hill, 2001; Purves et al., 2000; Saurina, Hernandez-Cassou, 1999; St. Louis, Hill, 1990; Stone et al., 2001; Taylor, 1996; Vora et al., 1987; Wu et al., 2000). Спектр ионной подвижности отражает ионные подвижности, которые коррелируют с отношением размера к заряду у образца.

В спектрометре ионной подвижности (СИП):

1) испаряющиеся молекулы образца, находящиеся в газовой фазе, ионизируются;

2) заряженные молекулы (ионы) образца ускоряются электрическим полем;

3) измеряется и регистрируется время их пролета в газовой среде дрейфового канала (рис. 10.1–10.6).



Рис. 10.1. Принцип действия спектрометров ионной подвижности. Генерируемые молекулярные ионы накапливаются в реакционной зоне. Селекторный (стрибирующий) импульс переносит молекулярные ионы в дрейфовый канал, где они ускоряются с помощью электрического поля. В газовой среде дрейфового канала ионы с различной подвижностью достигают детектора за разное время.

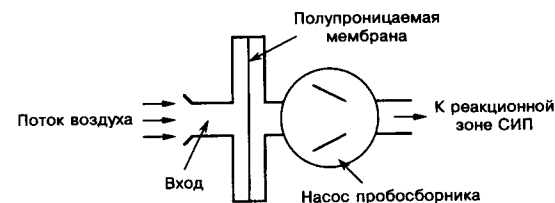


Рис. 10.2. Устройство ввода образца для СИП. Насос для отбора проб прокачивает воздух через полупроницаемую мембрану, которая задерживает крупные частицы пыли и прочие примеси (см. Spangler, 1982). Для этого подходит пленка из политетрафторэтилена (ПТФЭ) толщиной в 5–50 мкм или мембрана из силиконового каучука (Kotiaho et al., 1995; Sprangler, Carrico, 1983). Для обнаружения биологических агентов с помощью СИП вместо мембраны более подходящей может оказаться металлическая сетка вследствие ее лучшей проницаемости для высокомолекулярных соединений.

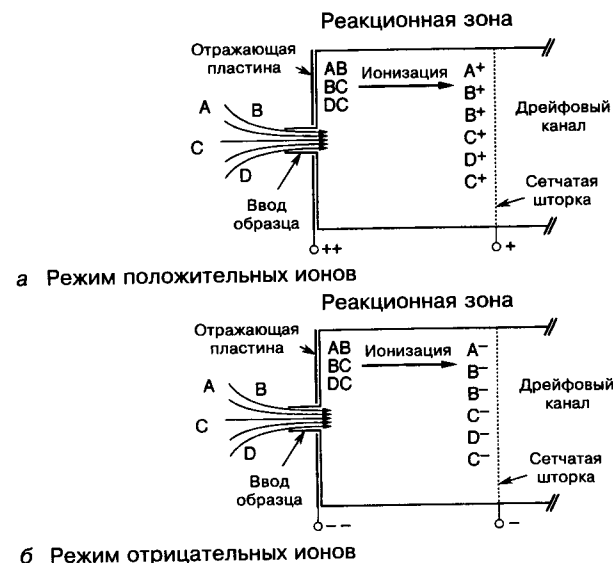


Рис. 10.3. Реакции образца в реакционной зоне. Молекулы образца ионизируются либо непосредственно путем диссоциации, либо опосредованно путем образования кластеров с другими ионами. В положительном режиме положительные ионы отражаются от отражающей пластины и накапливаются перед сетчатой шторкой (а). В отрицательном режиме аналогичным образом накапливаются отрицательные ионы (б). Многие СИП работают попеременно в положительном и отрицательном режимах.

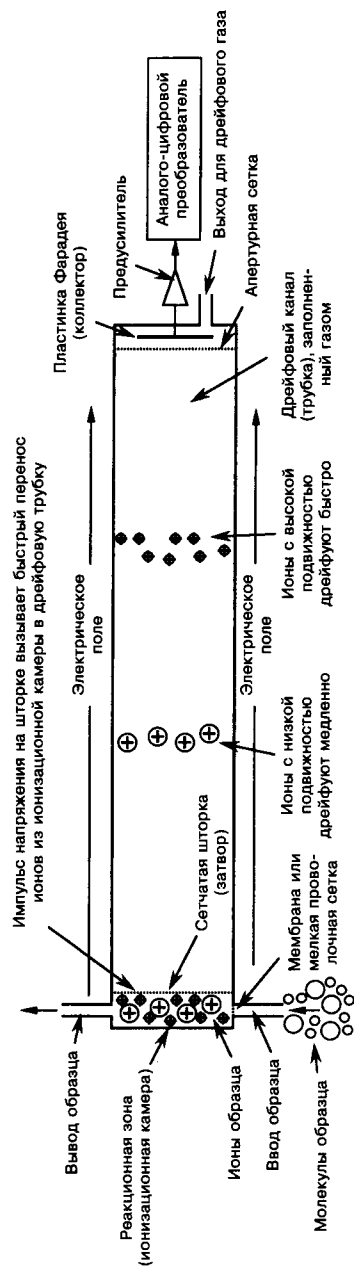


Рис. 10.4. Принцип действия спектрометра ионной подвижности (СИП) (Sagol et al., 1971; Cohen, Karasek, 1970; Eiseman, Kagan, 1974; Karasek, 1975; Kelle, 1974). Молекулы образца впрыскиваются в реакционную зону, где они ионизируются. Реакционная камера отделена от дрейфового канала тонкой мембраной или мелкой проволочной сеткой. Электрический импульс, прилагаемый к сетчатой шторке, переносит ионы в дрейфовый канал, где ионы ускоряются электрическим полем, которое генерирует защитные кольца (см. рис. 10.5 и 10.6). Время пролета ионов в газовой фазе измеряется с помощью пластины Фарадея или коллекторной сетки. Подвижность иона в газовой фазе измеряется как поперечное сечение его столкновений, которое в свою очередь зависит от его размера и структуры. Малые ионы с компактной структурой имеют меньшее поперечное сечение, чем большие ионы с рыхлой структурой, соответственно. Поскольку разные ионы имеют разную подвижность в газе дрейфовой трубки, они могут давать различные пики в спектре ионной подвижности. Компьютер (не показан) определяет идентичность молекул образца путем сопоставления наблюдаемого спектра со стандартными сигналами. Для того чтобы снизить шум, СИП обрабатывают медной фольгой (не показана) и коллектор присоединяют непосредственно к предусилителю (10^{10} В/А) с помощью очень короткого кабеля (длиной в несколько миллиметров). Для достижения низкого уровня шума в конструкции предусилителя используют специально подобранные резисторы с обратной связью. Так как флуктуации электрического поля в дрейфовом канале создают дополнительные шумы в сигнале на пластине Фарадея, то используют сверхстабильные источники тока. В противоположность масс-спектрометрам, в этих устройствах нет необходимости использовать вакуумные насосы или дорогие временные жизни, электрические усилители, энергопотребляющие вакуумные величины превышают чувствительность масс-спектрометров. Время дрейфа макромолекул в дрейфовой трубке длиной 3–20 см с градиентом напряжения в диапазоне не 100–1000 В/см обычно составляет от миллисекунд до секунд. В большинстве СИП достаточно несколько секунд продвигать, чтобы очистить дрейфовый канал.

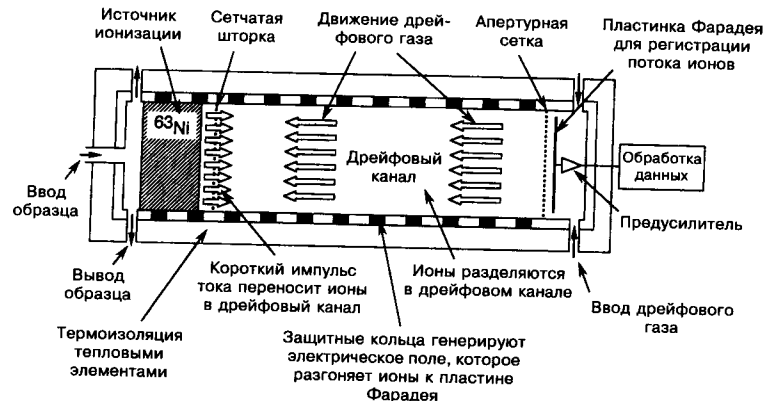


Рис. 10.5. Устройство СИП (Caroll et al., 1971; Cohen, Karasek, 1970; Eiceman, Karas, 1994; Matz, Schröder, 1996, 1997; IUT Institute for Environmental Technologies, Берлин, Германия; Bruker Daltonik, Бремен, Германия; Graseby Dynamics, Лондон, Великобритания; Battringer Instruments, Warren, NJ, США). Источник ионизации ионизирует молекулы образца. Защитные кольца генерируют электрическое поле, которое ускоряет ионы образца в направлении к сетчатой шторке, где они накапливаются. Через несколько секунд к шторке прикладывается импульс напряжения, который вызывает перенос ионов образца в дрейфовый канал. Теперь электрическое поле может перемещать ионы образца в направлении к детектору ионов (пластинке Фарадея). Разные ионы по-разному реагируют с молекулами дрейфового газа в дрейфовом канале. В результате ионы распределяются по длине канала в соответствии с их различной подвижностью. Регистрируемый спектр ионной подвижности отражает разницу во времени их пролета. Обычно дрейфовый канал имеет длину в несколько сантиметров и сила электрического поля составляет 100–1000 В/см. При таких силах поля и длинах каналов ионам небольших органических соединений, подвижность которых имеет порядок величины в несколько $\text{см}^2 \text{В}^{-1} \text{с}^{-1}$, требуется около 1–100 миллисекунд, чтобы достичь детектора. Подвижность биологических макромолекул на 1–3 порядка медленнее. Дрейфовый канал и реакционная зона термостатируются с помощью тепловых элементов. Рабочая температура для обнаружения биологических агентов обычно составляет 100–150°C.

Такие простые спектрометры могут обнаруживать и анализировать поразительно малые следы как небольших, так и макромолекул, и их скоплений (кластеров).

В конструкцию СИП входят:

- 1) термоизолированная полость, источник ионизации, реакционная камера, сетчатый обтюратор, дрейфовый канал с защитными кольцами, возможно наличие апертурной сетки, коллектора;
- 2) источник очищенного газа или газовый фильтр;

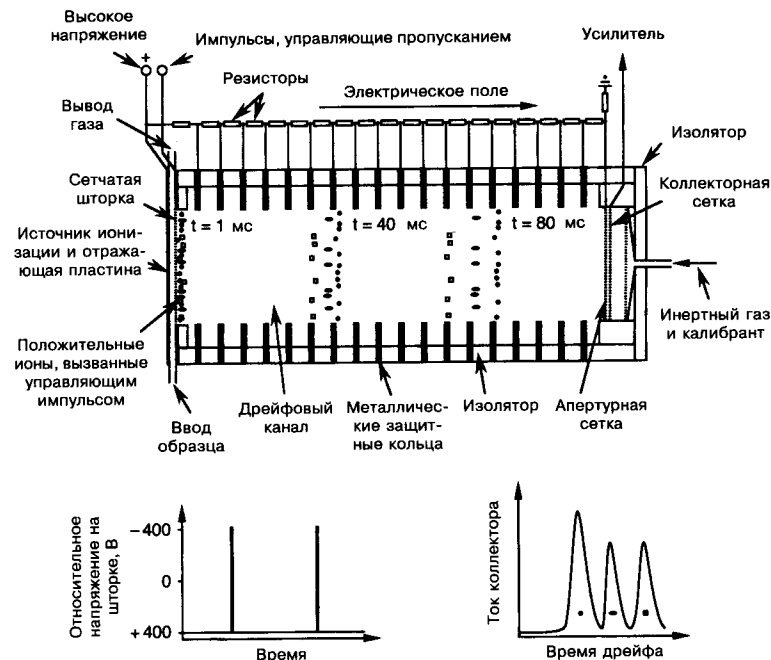


Рис. 10.6. Вверху: конструкция СИП, содержащая пакет из 18 медных защитных колец, которые изолированы керамическими прокладками и соединены резисторами. Эти резисторы подбираются так, чтобы минимизировать шум. Стабильность источника питания для защитных колец не должна выходить за пределы 0,1% средней квадратичной ошибки. Для гарантии однородности электрического поля защитные кольца имеют достаточно узкие разграничители. В данном примере СИП работает в положительном режиме. Внизу слева: Пример напряжения на шторке. Большую часть времени положительное напряжение на шторке не позволяет положительно заряженным ионам проникать в дрейфовый канал. После того как за некоторый период времени положительные ионы накопились около шторки, к ней прилагается импульс отрицательного напряжения. После этого положительные ионы попадают в дрейфовый канал, где они еще более ускоряются. Внизу справа: регистрируемый спектр.

- 3) регулятор шторки;
- 4) источник высокого напряжения
- 5) электрометр;
- 6) устройство контроля температуры;
- 7) компьютеризированный накопитель данных и процессор.

Наибольшее преимущество СИП заключается в его исключительной чувствительности (см. разд. 10.2). Другое важное преимущество

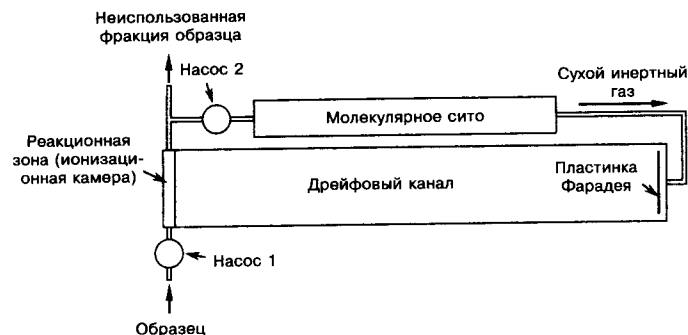


Рис. 10.7. Очистка и осушение инертного газа с помощью молекулярного сита (Carnahan, Tarassov, 1998; Taylor, Turner, 1999). Оптимальные параметры: длина дрейфового канала 5–20 см, его диаметр 2–3 см, высота ионизационной камеры 0,5–1 см, скорость первого насоса 5–50 мл/мин, второго насоса — 50–500 мл/мин.

СИП по сравнению с большинством масс-спектрометров — его низкая цена и низкое потребление энергии, потому что он не требует вакуумной установки. Это делает его особо пригодным для широкомасштабных применений.

Для многих органических молекул вполне подходящим инертным газом является азот, но и очищенный воздух также может использоваться для этих целей. Очистка потока газа от паров воды и примесей образца часто производится с помощью молекулярных сит (рис. 10.7). Такие молекулярные сита производятся из цеолитов, каковыми являются алюмосиликаты. Цеолиты способны адсорбировать молекулы воды и другие небольшие молекулы органических соединений. После нескольких недель или месяцев эксплуатации в СИП цеолиты насыщаются, и их можно легко регенерировать нагреванием в печи и использовать повторно.

10.2. Разрешающая способность и чувствительность

Разрешение R для СИП определяется как:

$$R = 0,5 \cdot t_d \tau^{-1}, \quad (10.1)$$

где t_d есть время разделения пика, а τ — его временная ширина, соответствующая полувысоте пика (St. Louis, Hill, 1990).

Важными факторами, влияющими на разрешение являются:

- 1) ширина и форма начального импульса;
- 2) уширение за счет кулоновского отталкивания между ионами в обоих направлениях: в сторону реакционной зоны и в сторону дрейфового канала;

- 3) ширина начального импульса ионов (ширина шторки);
- 4) ион-молекулярные и ион-ионные реакции в реакционной зоне;
- 5) утоньшение заслонки;
- 6) ион-молекулярные реакции в разделительной зоне;
- 7) пространственное уширение пакета ионов в процессе разделения вследствие диффузии;
- 8) неоднородности температуры и давления внутри спектрометра;
- 9) емкостное сопряжение между апертурной сеткой и коллектором;
- 10) время реакции предусилителя и усилителя и аналого-цифрового преобразователя.

Уширение вследствие кулоновского отталкивания особенно значительно в конструкциях с узкими реакционными зонами и дрейфовыми каналами.

R сильно зависит от конструкции спектрометра, но теоретически может превышать 1000 (рис. 10.8–10.10). Для высокого разрешения требуется относительно массивная конструкция с дрейфовым каналом достаточно большой длины и диаметра и высокое напряжение. Большинство СИП имеют разрешение только 20–150, так как они оптимизированы в отношении низкого веса и портативности.

R задается уравнением 10.2 (Hill et al., 1990; Leonhardt et al., 2001; St. Louis, Hill, 1990):

$$R = \left[16 \ln 2 \frac{k_B T}{q V_d} + \frac{K^2 V_d^2}{I_d^4} \left(t_{Pulse} - \frac{s^2}{K V_{Pulse}} \right)^2 + \left(\frac{a^2 V_d}{I_d^2 V_{ap}} \right)^2 + \frac{t_{Pulse}^2 K^2 V_d^2}{I_d^4} \right]^{-\frac{1}{2}}, \quad (10.2)$$

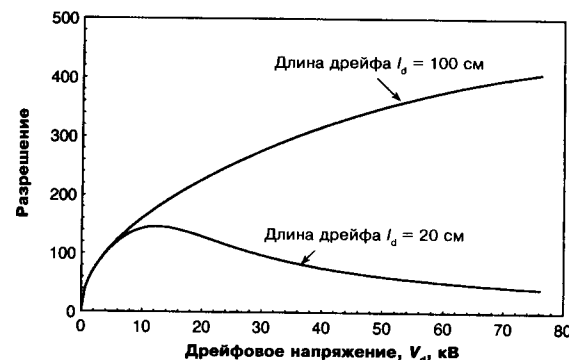


Рис. 10.8. Теоретическое разрешение СИП при различных длинах дрейфа. При коротких длинах дрейфа повышение дрейфового напряжения выше оптимума не улучшает разрешающую способность. Параметры в этом примере: температура 130°C, ионная подвижность $10^{-5} \text{ м}^2 \text{ В}^{-1} \text{ с}^{-1}$, напряжение импульса на шторке 100 В, длина реакционной зоны 3 мм, расстояние между апертурной сеткой и пластинкой Фарадея 1 мм, напряжение на апертурной сетке 500 В.

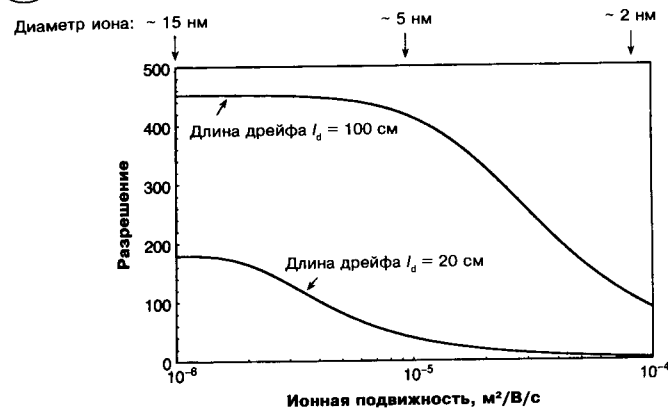


Рис. 10.9. Теоретическое разрешение СИП при различных длинах дрейфа и ионной подвижности. Удлинение импульсов на шторке повышает чувствительность, но ограничивает разрешение для небольших ионов. Параметры в данном примере: температура 130°C, дрейфовое напряжение 80 кВ, ширина начального ионного импульса 1 мс, напряжение импульса на шторке 1000 В, длина реакционной зоны 3 мм, расстояние между апертурной сеткой и пластинкой Фарадея 1 мм, напряжение на апертурной сетке 500 В.

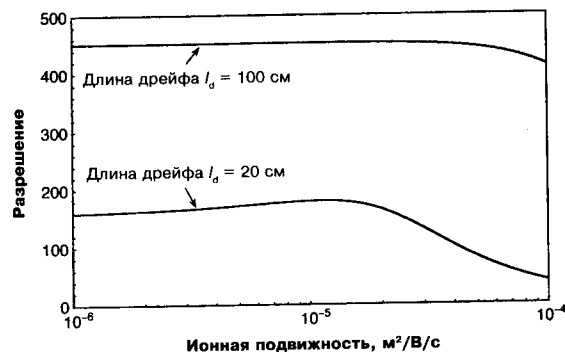


Рис. 10.10. Теоретическое разрешение СИП при различных длинах дрейфа и ионной подвижности. Короткие импульсы на шторке и длинные пути дрейфа дают высокое разрешение как для молекул среднего размера, так и для больших молекул. Параметры в данном примере: температура 130°C, дрейфовое напряжение 80 кВ, ширина начального ионного импульса 100 мкс, напряжение импульса на шторке 1000 В, длина реакционной зоны 3 мм, расстояние между апертурной сеткой и пластинкой Фарадея 1 мм, напряжение на апертурной сетке 500 В.

где k_B — константа Больцмана ($1,3807 \times 10^{-23}$ Дж К⁻¹); T — абсолютная температура; q — заряд иона; V_d — напряжение разделения; l_d — длина разделения; K — подвижность иона; t_{pulse} — ширина начального импульса ионов; V_a — напряжение импульса на шторке; s — расстояние между пространственным зарядом в реакционной зоне и решетчатой шторки (примерно половина длины реакционной зоны); a — расстояние между апертурной решеткой и пластинкой Фарадея; V_{ap} — напряжение на апертурной решетке.

Чувствительность СИП может быть в 1000 раз выше, чем у хорошего масс-спектрометра. С обычной электроникой теоретически можно обнаружить до 1000 ионов, что соответствует 3×10^{-19} г ТНТ (тринитротолуола) или $2,5 \cdot 10^{-16}$ г ботулинового яда ($M_w = 150$ кДа). Для сравнения в отпечатке пальца человека содержится в миллиарды раз больше остатков органического вещества. На практике пределы обнаружения с помощью СИП обычно достигают величин порядка 0,1–100 ppbv (частей на миллиард по объему, т. е. 10^{-9}). Одной из причин такой исключительной чувствительности по сравнению с масс-спектрометрами является простое и крупное входное отверстие. Многие СИП в качестве входного отверстия содержат тонкую полимерную мембрану или мелкую сетку большой площади, которые допускают лишь небольшие потери образца (рис. 103; Katiaho et al., 1995; Spangler, 1982; Spangler, Carrico, 1983). В некоторых СИП входное отверстие для образца состоит всего лишь из трубки с фильтром, который до введения образца в СИП удаляет из него частицы пыли и в некоторых случаях воду.

Короткие импульсы на входе и высокая влажность снижают чувствительность. Для ослабления шума пригодны все известные средства, такие как:

- 1) малая емкость коллектора;
- 2) высокая стабильность напряжения на защитных кольцах;
- 3) электрическая защита всего СИП;
- 4) резисторы с низкими шумами в электронике.

Боле того, чтобы достичь высокую чувствительность и нижний предел памяти, СИП должны быть сделаны из таких материалов, которые бы очень слабо адсорбировали молекулы образца, например, специальная керамика.

На чувствительность и разрешающую способность влияют также присутствие или отсутствие апертурной решетки. Функция апертурной решетки заключается в емкостном отделении коллектора (пластина Фарадея или решетка коллектора) от надвигающегося облака ионов. Без апертурной решетки коллектор регистрирует надвигающееся облако ионов на несколько миллиметров раньше его прибытия, что приведет к уширению полосы (St. Louis, Hill, 1990). С другой стороны, апертурная решетка нейтрализует ионы, которые снижают ионный ток и чувствительность примерно в три раза.

10.3. «Нюхатели»¹ на основе СИП

Нюхатели на основе СИП представляют собой переносные приборы, используемые для обнаружения опасных веществ (рис. 10.11 и 10.12). Они состоят из небольшого СИП и базы данных с сигнатурами интересующих веществ и им сопутствующих. Всего за несколько секунд процессор идентифицирует и сигнализирует об обнаружении агента. Такие приборы весьма малогабаритны, их длина составляет 25–40 см и весят они около 2–10 кг. Частота ложных обнаружений достаточно низка и обычно составляет 0,01–1%.

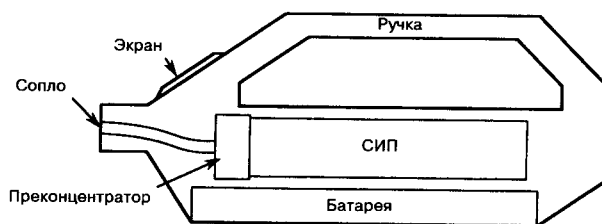


Рис. 10.11. Переносной «нюхатель», состоящий из химического преконцентратора и СИП (Sandia Corp., Albuquerque, NM и Barringer instrummys, Inc., Warren, NJ).

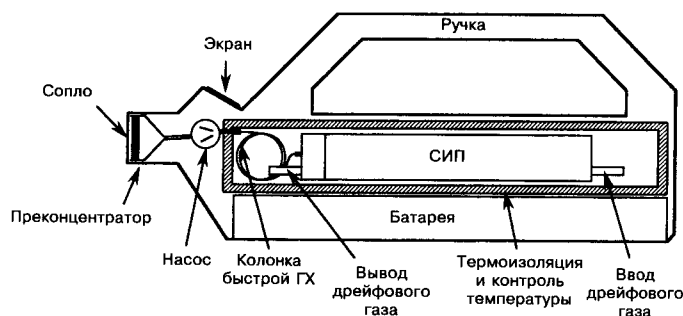


Рис. 10.12. Переносной нюхательный детектор в сочетании с быстрым газовым хроматографом (см. Snyder et al., 1993). Сочетание с ГХ примерно на порядок снижает долю ложных сигналов тревоги при обнаружении вредных веществ.

¹ В оригинале: «sniffers» — 1) тот, кто нюхает, вдыхает через нос, сопит и т. д.; 2) амер. сленг: наркоман, нюхающий наркотик; 3) сленг: нос, син.: nose; 4) техн., разг. прибор для обнаружения взрывоопасной концентрации газов в воздухе, утечки газа, радиации и т. п.; 5) gas sniffer — электронный газоанализатор; 6) sniffer dog — собака, натренированная на обнаружение различных веществ по запаху: наркотиков, взрывчатки и т. п. В отечественной литературе используется также название «электронный нос» (см. Ганшин и др.).

10.4. Детали конструкции

На рис. 10.11 и 10.12 показаны портативные детекторы на основе СИП и ГХ/СИП с концентраторами. Газовый хроматограф (ГХ) в комбинации с СИП значительно снижает частоту ложно-тревожных обнаружений вредных веществ. Концентраторы (рис. 10.13) повышают концентрацию анализируемого вещества и чувствительность метода более чем в 1000 раз и тем самым еще более снижают долю ложных обнаружений.

Спектрометрия ионной подвижности в некоторых аспектах похожа на электрофорез (рис. 10.14). Поэтому поначалу ее называли «плазменной хроматографией». Однако следует иметь в виду, что в противоположность обычной хроматографии СИП имеют узкий линейный участок определения вследствие влияния поверхностного заряда и подвержены серьезным помехам из-за взаимодействия с матриксом и из-за задержек памяти (Bird, Keller, 1976; Blanchard, Bacon, 1989; Spangler, 1992b).

Поскольку большинство интересующих химических и биологических веществ не являются заряженными, перед проведением анализа их приходится заряжать. В табл. 10.1 и на рис. 10.15 и 10.16 представлены методы ионизации, используемые в СИП. Наиболее распространенными способами являются радиоактивные изотопы и фотоионизация. Например, когда в качестве источника для ионизации используют фольгу из ^{63}Ni и воздух в качестве разделяющей газовой среды, основные первичные ионы: N_2^+ , NO^+ и O_2^+ оказываются короткоживущими. Эти первичные ионы быстро реагируют со следами воды в разделятельном газе и образуют кластеры типа $\text{N}_2^+(\text{H}_2\text{O})$, $\text{NO}^+(\text{H}_2\text{O})_m$ и $\text{O}_2^+(\text{H}_2\text{O})_k$. Для фотоионизации с помощью водородно-плазменных разрядных ламп и крип-

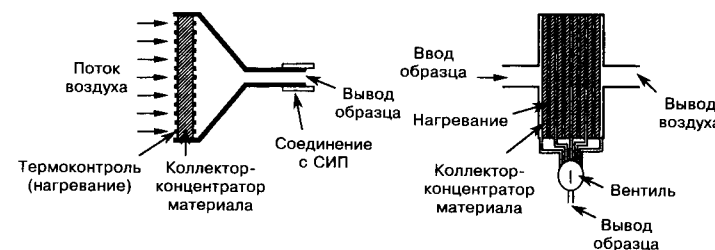
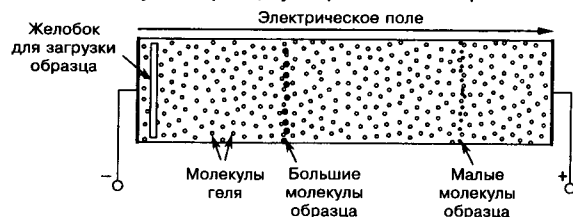


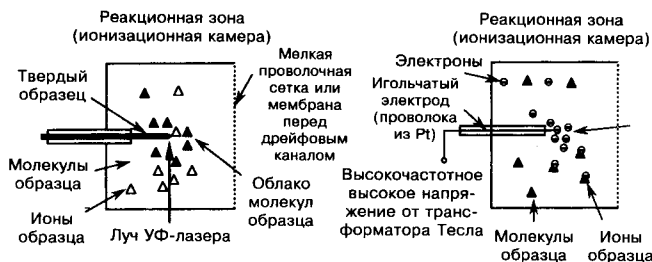
Рис. 10.13. Два варианта конструкции преконцентраторов для спектрометрии ионной подвижности. Он всасывает большой объем воздуха и собирает на крупные биологические и органические соединения. Фильтр сделан из цеолитов — материала, который часто используется в качестве молекулярных сит (см. рис. 10.7). Через несколько минут отбора пробы нагреватель испаряет органический материал в небольшой порции объема воздуха, которая доставляется в СИП. Такие преконцентраторы повышают концентрацию образца в 10–1000 раз (см. Spangler, 1992a).

Заряженные молекулы образца ускоряются электрическим полем:



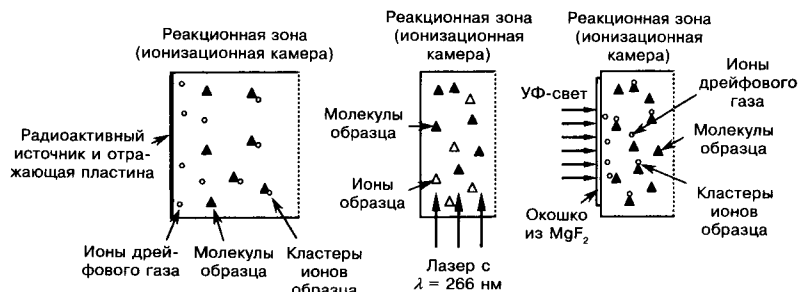
Взаимодействие с молекулами геля по-разному замедляет ионы различного размера и типа; регистрация обычно оптическая

Рис. 10.14. Типичная установка для электрофореза демонстрирует аналогию со спектрометрией ионной подвижности. В обоих методах заряженные молекулы ускоряются электрическим полем и замедляются взаимодействием с молекулами в стационарной фазе. В электрофорезе стационарной фазой обычно является гель, и перемещения молекул образца часто можно регистрировать оптическими методами. В спектрометрии ионной подвижности газ служит стационарной фазой, и перемещения ионов образца детектируются электрическими методами. Малый размер и большой заряд коррелируют с большой скоростью ионов.



а Лазерная десорбция и ионизация твердого образца

б Ионизация электрическим разрядом



в Ионизация радиоактивным источником

г Фотоионизация УФ-лазером и криптоновой лампой с окошком из MgF₂

Рис. 10.15. Примеры методов ионизации (см. также табл. 10.1).

тоновых плазменно-разрядных ламп требуется поток фотонов около $10^{12} \text{ см}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Геометрия сетчатой шторки выбирается таким образом, чтобы большинство фотонов не могли проникнуть в штретовый канал, иначе это понизит разрешение. Обычно используемые в СИП радиоактивные источники имеют то преимущество, что время их полужизни исчисляется несколькими годами. Для иммобилизации ^3H его внедряют посредством адсорбции (геттерируют) в тонкую титановую пленку.

Таблица 10.1. Общие методы ионизации образцов в спектрометрии ионной подвижности (Baim et al., 1983; Begley et al., 1991; Borsdorf, Rudolph, 2001; Borsdorf et al., 2000; Budovich et al., 1999; Carnahan, Tarasov, 1995; Davies, 1994; Düring et al., 1999; Eiceman et al., 1988; Leasure et al., 1986; Lee et al., 1998; Leonhardt, 1996; Lubman, Kronick, 1982, 1983; Mergerle, Cohn, 2000; Phillips, Gormally, 1992; Schnurpfeil, Klepel, 2000; Shumate, Hill, 1989; Spangler et al., 1994; Wu et al., 1998 a,b, 2000)

Метод ионизации	Пример
Радиоактивные изотопы	^3H , ^{241}Am или ^{63}Ni ; рис. 10.5
Фотоионизация	УФ или ВУФ свет от криптоновой или водородной лампы с окошком из MgF_2 (30 Вт) или Nd:YAG-лазер с $\lambda = 266 \text{ нм}$ (рис. 10.15). Для усиления ионизации добавляют соединения, поглощающие ВУФ
Электрораспыление	Гл. 3, рис. 3.11
Лазерная десорбция	Рис. 10.15
Электрические (коронные) разряды	Рис. 10.15

СИП приобрели важное практическое значение в контексте обнаружения ультра-следовых количеств химических и биологических примесей (Dworzanski et al., 1997; Ogden, Strachan, 1993; Smith et al., 1997; Snyder et al., 1991a,b; 1996a,b; 1999; 2000; Strachan et al., 1995), взрывчатых веществ (рис. 10.17; см. Fetterolf, Clark, 1993; Steinerfeld, Wormhoudt, 1998), запрещенных лекарственных средств (см. Keller et al., 1998; Miki et al., 1997, 1998), пестицидов, для обнаружения животных и их активности в джунглях и в других типах мониторинга окружающей среды.

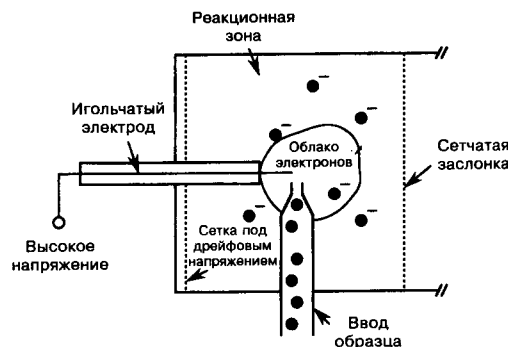


Рис. 10.16. Газовый выпуск для ионизации электрическими (коронными) разрядами.

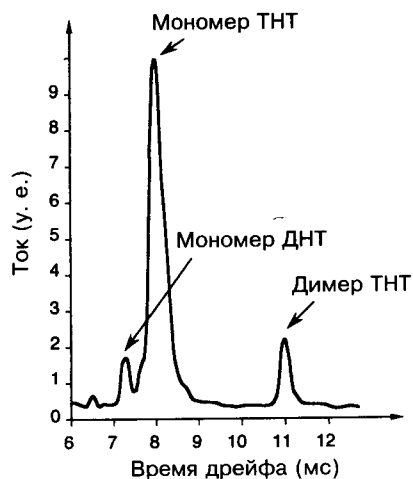


Рис. 10.17. Спектрограмма ионной подвижности ТНТ (тринитротолуола). По данным, предоставляемым производителем СИП — Institute for Environmental Technologies Ltd., Берлин.

На рис. 10.18 показана конструкция двухканального детектора для СИП. В одной из двух колонок такого детектора осуществляются физические и химические модификации образца, например, путем добавления обработанного кислотой газа, поскольку заряд большинства белков сильно зависит от pH (см. гл. 2 в Nölting, 1999b²). Такая конструкция улучшает различение ряда биологических и некоторых химических веществ. Таким образом, с изменением pH изменяется заряженное

² См. сноску 3 на стр. 15.

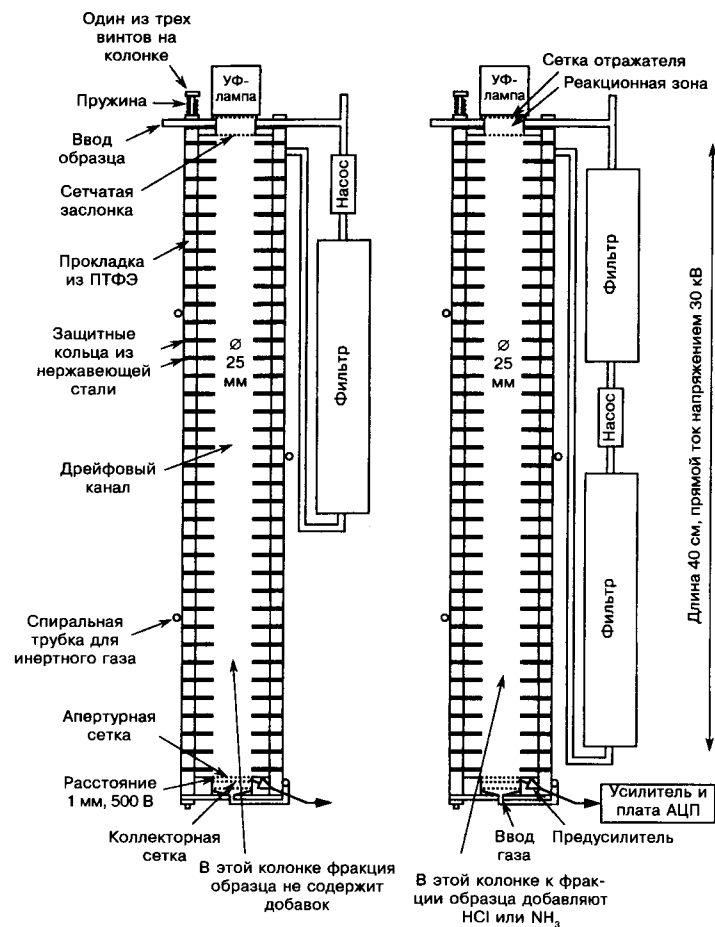


Рис. 10.18. Двухканальный спектрометр ионной подвижности высокого разрешения. Для снижения доли ложных идентификаций агентов образец здесь анализируется одновременно двумя различными способами. В одной из колонок образец с помощью химических добавок подвергается химической и (или) физической модификации.

состояние белоксодержащего биологического материала и, соответственно, изменяется скорость его диффузии в дрейфовом канале. Кроме того, добавленный газ может вызвать химические изменения некоторых химических и биологических агентов. Это вызывает специфические изменения в спектрах СИП и таким образом вносит вклад в улучшение правильной идентификации агентов. Многоканальные конст-

рукции еще более снижают частоту ложно-тревожных обнаружений с помощью СИП. Каналы могут работать в том же направлении, ускоряя измерение медленно дрейфующих веществ. В других схемах образец можно одновременно распределить по разным каналам, которые работают в разных режимах, и это также может повысить разрешающую способность метода.

СИП с осциллирующим электрическим полем позволяет применять поля большой напряженности без необходимости прилагать очень высокое напряжение (рис. 10.19). Поскольку очень крупные макромолекулы имеют низкие подвижности, для их быстрого обнаружения с высоким разрешением требуется высокая напряженность электрического поля в разделительной камере. В обычных приборах это может вызвать проблемы безопасности и повысить цену СИП.

Для измерений на твердых образцах требуются специальные входные отверстия с подогревом и термостойкой пористой мембраной (см. рис. 10.20) и, возможно, повышенная температура всего СИП.

Электростатические линзы, фокусирующие ионы в направлении коллектора, могут снизить размер коллектора и его емкость (рис. 10.21). Это снижает уровень шумов и может повысить чувствительность.

Техника генерации высокого напряжения, которая необязательно требует большого веса прибора, показана на рис. 10.22: набор конденсаторов заряжается параллельно и затем объединяется в последовательные блоки.

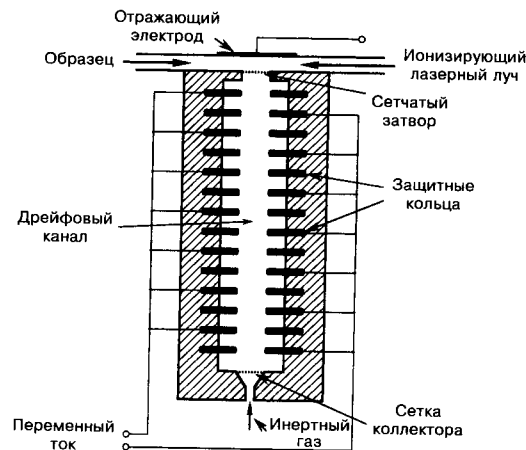


Рис. 10.19. СИП с осциллирующим электрическим полем на защитных кольцах вместо постоянного электрического поля. Только те ионы, движение которых совпадает по фазе с осцилляциями электрического поля, способны перемещаться по дрейфовому каналу и достигать коллектора. Дальнейшие детали устройства см. Martin et al., 1998.

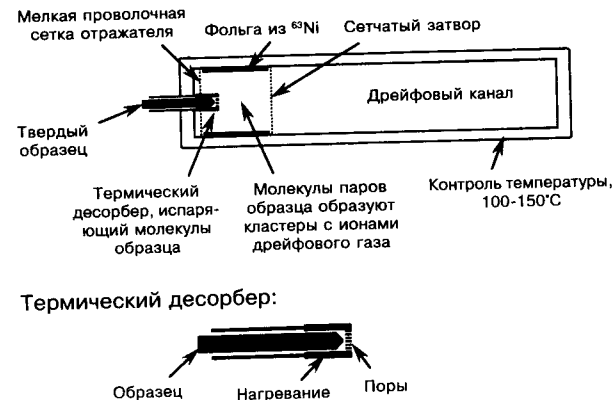


Рис. 10.20. Модифицированный СИП для обнаружения химических агентов, содержащихся в образцах почвы и для идентификации разнообразных твердых материалов, например, дерева (Lawrence et al., 1991; Matz, Schruder, 1997; Schröder, 1998).

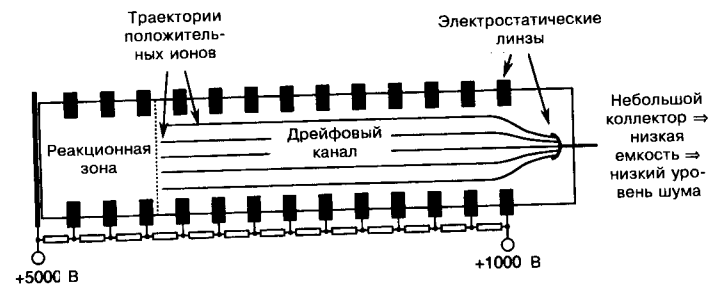


Рис. 10.21. Снижение шумов с помощью коллекторной сетки меньшего размера. Коллектор и защитное кольцо перед коллектором действуют совместно как электростатические линзы. Чем меньше коллектор, тем меньше шум и, следовательно, выше чувствительность.

Параметрами, которые важны для высокой воспроизводимости спектров СИ, являются постоянный уровень влажности, постоянная напряженность поля, постоянный источник ионизации, эффективное удаление предыдущих образцов, механическая стабильность. Последнее может быть улучшено с помощью специальной конфигурации защитных колец (рис. 10.23). На рис. 10.24—10.26 показаны дальнейшие важные новшества в спектроскопии ионной подвижности.

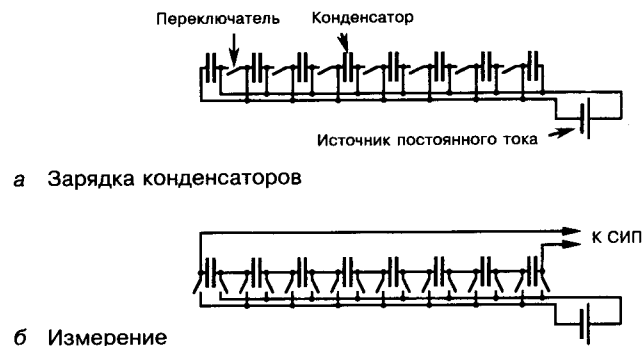


Рис. 10.22. Генерирование высокого напряжения для СИП (Goebel, Breit, 2000):

а — набор конденсаторов заряжается при напряжении V ; б — конденсаторы соединены вместе для генерации более высокого напряжения nV .

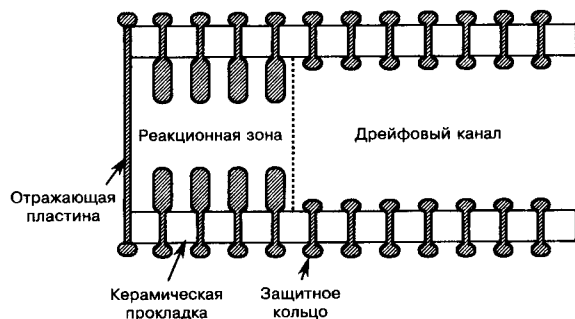


Рис. 10.23. Повышение механической стабильности дрейфового канала. Аналогичную конструкцию см. у Kagi, 1994.

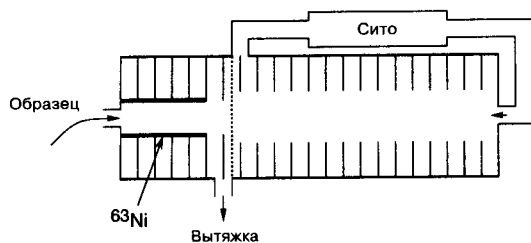


Рис. 10.24. Улучшение очистки реакционной зоны (см. Snyder et al., 1993) и повышение однородности электрического поля: вывод образца располагается близко от сетчатого затвора и диаметр реакционной зоны меньше, чем диаметр дрейфового канала.

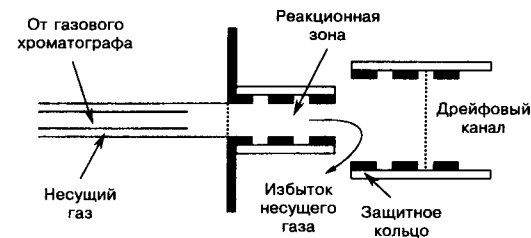


Рис. 10.25. Выведение паров твердого образца из газового хроматографа в СИП с помощью слабого потока несущего газа.

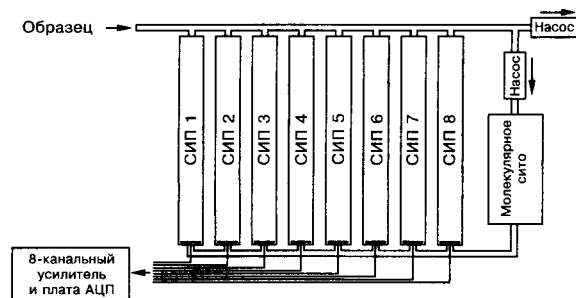


Рис. 10.26. Многоканальный спектрометр ионной подвижности. Все каналы действуют синхронно, и этим достигается восьмикратное повышение скорости анализа. Для снижения доли ложных идентификаций один и тот же образец можно распределить по разным каналам, которые работают в разных режимах (см. Turner, 1993).

10.5. Обнаружение биологических агентов

К сожалению, многие биологические агенты слишком велики для прямого обнаружения. Скорость V для крупных сферических частиц зависит от их заряда z , их радиуса r , напряженности электрического поля E и вязкости среды η :

$$V = zE(6\pi\eta r)^{-1}. \quad (10.3)$$

Небольшие химические соединения обычно движутся в СИП со скоростью в несколько метров за секунду. Но для единично заряженных частиц пыли ($z = 1,6 \times 10^{-19}$ Ку) с радиусом около 1 мкм в воздухе ($\eta_{\text{возд.}} = 1,8 \times 10^{-5}$ Н с м $^{-2}$) при напряженности поля $E = 300$ В мм $^{-1}$ скорость составляет всего примерно 0,14 мм с $^{-1}$. При более высокой частоте стробирования последующие спектры медленно движущихся

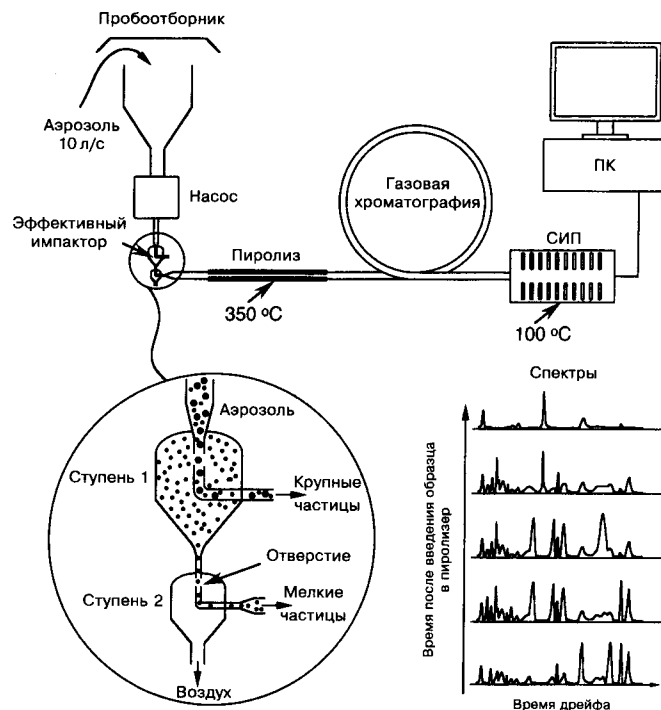


Рис. 10.27. Установка СИП для обнаружения биологических агентов (см. Snyder *et al.*, 2000). Эффективный пробоотборник атмосферных частиц (импактор) отбирает частицы определенного размера, например в диапазоне 1–10 мкм, и переносит их в пироллизную трубку. За несколько секунд в ходе пироллизной реакции, например при 350 °C, частицы биологического происхождения частично разрушаются. Для повышения разрешающей способности последующего анализа продуктов пироллизной реакции используется комбинация быстрой газовой хроматографии и СИП. Обычная рабочая температура ГХ/СИП составляет 80–150 °C. Принцип действия эффективного импактора см. на рис. 3.20. Пи-ГХ/СИП позволяет гораздо более однозначно идентифицировать следы биологических агентов, чем одно только измерение распределения частиц по размеру.

агентов будут накладываться друг на друга. Поэтому средний размер и распределение размеров биологических агентов даст мало информации о конкретной природе агента. Вот почему биологические агенты пиролизируют перед анализом в СИП (рис. 1.27). Пироллиз (см. также



Рис. 10.28. Образец частицы пыли с опасной биологической примесью. Легкие и ворсистые композиции бактериальных спор и вирусных частиц с пылеобразующими частицами диаметром 1–5 мкм могут дрейфовать в сухом воздухе на сотни миль и с дыханием могут проникать глубоко в легкие (Preston, 1998).

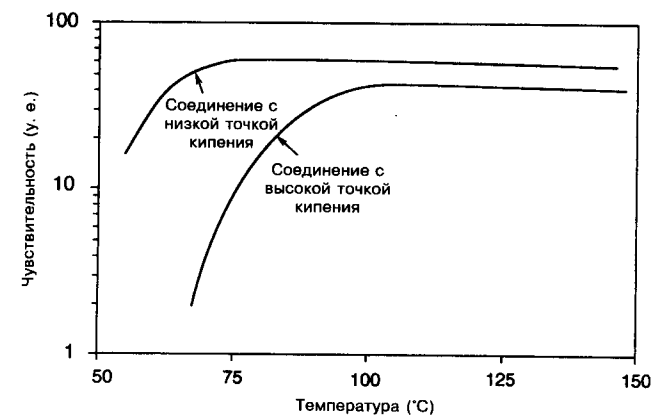


Рис. 10.29. Типичная чувствительность СИП при определении соединений с различными точками кипения и давлением паров.

разд. 3.2), в результате которого получаются летучие фрагменты биологических агентов, можно применять к вирусам и бактериям (рис. 10.28). Из-за низкого давления паров для большинства биологических соединений требуются достаточно высокие температуры во время работы СИП (рис. 10.29). Действующая установка, состоящая из пробоотборника атмосферных частиц (импактора), пироллизера, газового хроматографа и СИП (рис. 10.27), способна обнаруживать всего несколько единиц бактериальных спор в нескольких тысячах литров объема.

³ ПАВ — поверхностно-активное вещество, сурфактант.

Добавленная литература

1. Ганшин В.М., Фесенко А.В., Чебышев А.В. От обонятельных моделей к «электронному носу». Новые возможности параллельной аналитики. <http://st.ess.ru/publications/articles/ganshin/ganshin.htm>.
2. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии (Серия «Методы в химии»). М.: БИНОМ Лаборатория знаний, 2003. 493 стр.
3. Луппу В.Б. Спектрометрия приращения ионной подвижности. <http://ktiger.uiggm.nsc.ru/RUSSIAN/spectr/spectr.htm>.
4. Портативный детектор взрывчатых веществ «МО-2м». http://www.belka-mvd.ru/directions/gas_analysis/mo-2m.
5. Портативный экспресс-анализатор для определения и идентификации взрывчатых веществ и наркотических соединений «ИОНСКАН 400В». <http://www.apg.ru/catalog/show.php?id=20>.
6. Рыбальченко И.В. Идентификация токсичных химикатов. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2002, т. XLVI, № 4, с. 64–70. <http://www.chem.msu.su/rus/journals/jvho/2002-4/64.pdf>.
7. Федоров Ю.А. Индикация наркотических веществ. http://st.ess.ru/publications/5_2001/fedorov/fedorov.htm.
8. IONSCAN Model 400 <http://www.ess.ru/scripts/des.asp?itm=1702&lvl=04.01.&tbl=04.01.01>.

ГЛАВА 11

АКУСТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИКРОВОЛН И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕДАЧИ МЫСЛЕЙ

Следует напомнить, что интенсивное электромагнитное излучение может быть опасным, и с ним надо обращаться с большой осторожностью и всегда руководствоваться при этом инструкциями и законами по безопасности. В ведущейся в настоящее время дискуссии об «электросмоге» (электромагнитном загрязнении) особо подчеркивается необходимость ответственного отношения к использованию электромагнитного излучения¹. Вот почему любое использование технологии передачи мыслей должно строго следовать всем требованиям существующего законодательства и этических норм. Конечно же, это касается и всех других научных методов.

11.1. Теоретическое обоснование

Современные теоретические представления о технологии передачи мыслей нацелены на то, чтобы преодолеть ограничения традиционных методов передачи информации, таких как, например, радио, телевидение, мобильные телефоны. Она может быть основана на избирательной индивидуальной восприимчивости некоторых людей к микроволнам, и может оказаться полезной, например, в случае несчастных случаев (Frey, 1962, 1963; Lin, 1978, 2000; Nölting, 2002). Теория свидетельствует о существовании реальной возможности осуществить передачу мыслей. Она предсказывает возможность создания методов и аппаратов для передачи мыслей с помощью электромагнитных волн. И при этом воспринимающий информацию человек не будет нуждаться в каких-либо специальных электронных приспособлениях для ее восприятия. Согласно этой концепции передача мыслей может

¹ Современную информацию см., например, на сайтах Центра электромагнитной безопасности (ЦЭМБ): <http://www.tesla.ru/index.html>, национального комитета по защите от неионизирующего излучения: <http://pole.com.ru/>, Международной комиссии по защите от неионизирующего излучения (ICNIRP): <http://www.icnirp.de/> и на сайте, посвященном электросмогу: <http://www.electrosmog.boom.ru/> и др.

осуществляться как отправка сфокусированного модулированного низкочастотного электромагнитного излучения в организм принимающего человека таким путем, что оно изменяет вероятность некоторых мыслей.

Одно из воплощений этой идеи могло бы стать таким:

- а) электрические сигналы голоса хранятся в памяти компьютера;
- б) компьютер преобразует эти сигналы в последовательность электрических импульсов, огибающая которых коррелирует с изменениями в интенсивности голоса;
- в) основной луч моделируется с помощью полученной последовательности импульсов;
- г) основной луч направляется на принимающего человека, и подбирается такая его интенсивность, чтобы она была чуть ниже интенсивности, которую может воспринять этот человек.

Другая реализация может быть такой:

- а) измеряют большое число корреляций между акустическими стимулами и мыслительными реакциями человека на них;
- б) на основе этих корреляций компьютер создает такую последовательность стимулов, которая с высокой вероятностью вызовет у человека определенную мыслительную реакцию;
- в) эта последовательность модулируется в сфокусированный луч электромагнитной энергии;
- г) луч посылается человеку с такими интенсивностью и продолжительностью, которые будут восприниматься им подсознательно;
- д) реакции человека отслеживаются с помощью микроволновых камер и, если необходимо, производится подстройка интенсивности луча.

Изобретение микроволновой акустики и технологии передачи мыслей может найти разнообразные применения, например, такие как:

- а) обеспечение связи с людьми, погребенными под руинами после землетрясения;
- б) для незаметной передачи информации охраняемому субъекту;
- в) поддержка важных персон на их публичных выступлениях;
- г) активизировать и упорядочить поведение людей при чрезвычайных ситуациях, например, посылая предупреждения о надвигающихся катастрофах;
- д) в комбинации с методами чтения мыслей у согласных на это людей способствовать лучшему пониманию функций мозга человека;
- е) осуществлять эффективное обучение или переучивание, когда другие способы неприменимы;
- ж) лечение и профилактика некоторых патологических недостатков в метаболизме мозга и снятие некоторых непатологических дефектов и стрессовых ситуаций.

11.1.1. Основная концепция технологии передачи мыслей

Современные средства массовой информации (СМИ), такие как радио и телевидение, нуждаются в специальных электронных устройствах, преобразующих электромагнитную энергию в воспринимаемые человеком акустические или оптические сигналы, и довольно часто люди не могут быть обеспечены такой информацией индивидуально.

С другой стороны, начиная еще с 1940-х годов, хорошо известно, что некоторые импульсы радаров воспринимаются людьми как оглушающий звук. Это явление было названо *микроволновым акустическим эффектом*. Начиная с 1960-х годов было предпринято большое число исследований слышимости при облучении головы модулированной микроволновой энергией (рис. 11.1; Brunkan, 1989; Frey, 1961, 1962, 1993; Frey, Corin, 1979; Frey, Messener, 1973; Lin, 1978, 1989, Stocklin, 1989). Известны также методы влияния электрических и акустических раздражителей на эмоции (Gall, 1994; Meland, 1980), и применение акустических сигналов для влияния на подсознание человека (Lowery, 1992).

Предлагаемая концепция передачи мыслей представляет дальнейшее развитие этих открытий и изобретений.

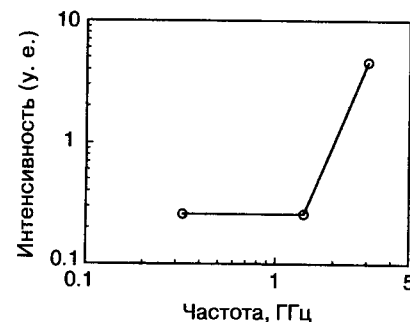


Рис. 11.1. Относительная интенсивность, которая необходима при некоторых экспериментальных условиях, для восприятия импульса модулированной микроволновой энергии (Lin, 1978).

11.1.2. Описание технологии

Согласно теоретической концепции передача мыслей на расстоянии основана на использовании направленного радио (радиопеленгации). В противоположность обычному направленному радио, в предлагаемой технологии электромагнитный луч взаимодействует непосредственно с организмом воспринимающего человека, например, с его головой, с корой головного мозга, внутренним ухом, акустическими и дру-

гими нервами. В зависимости от типа сигнала, модулированного в виде электромагнитного луча, такое взаимодействие вызывает преднамеренное изменение мыслей воспринимающего лица. В целом изменение мыслей является эффективным лишь статистически, например, вероятность некоторых мыслей может понизиться или повыситься в определенном направлении. Однако, в некоторых случаях изменение может быть детерминированным. В некоторых случаях передача мыслей возможна в комбинации с наблюдениями с помощью коротковолновых камер и передачи голоса, при которой используется осознанная слышимость модулированной микроволновой энергии. Но возможно и независимое применение этих методов.

Например, возможна следующая простая конструкция аппарата для передачи мыслей:

- а) оператор произносит слова в микрофон;
- б) электрические сигналы в микрофоне преобразуются в последовательности импульсов продолжительностью, скажем, в 100 мкс и перерывами между ними в 200 мкс;
- в) последовательности импульсов сохраняются в компьютере;
- г) те последовательности, которые соответствуют мыслям, которые требуется передать, извлекаются из компьютера;
- д) микроволновой луч модулируется с помощью извлеченной последовательности импульсов и посылается реципиенту, при этом интенсивность столь мала или используемые частоты или длительность сигналов таковы, что реципиент не осознает послания;
- е) влияние микроволнового луча на подсознание наблюдается оператором.

В более усложненной конструкции аппарата для передачи мыслей оператор вводит мысль, которую необходимо передать, в компьютер,

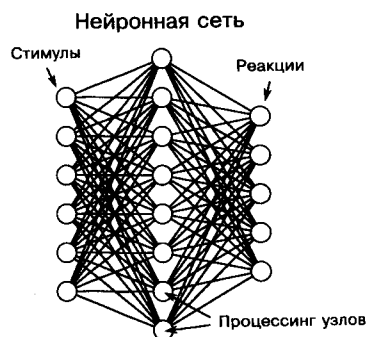


Рис. 11.2. Пример нейронной сети, интегрированной в программное обеспечение прибора для передачи мыслей. Она используется для вычисления набора стимулов, необходимых для вызывания определенных реакций или мыслей. Предварительно узлы нейронной сети подвергаются тренировке с большим числом реакций на определенные стимулы.

который с помощью таблиц или нейронных сетей (рис. 11.2) транслирует эту мысль в последовательность сигналов, модулирующих микроволновой луч, посылаемый принимающему человеку. Передаваемая последовательность сигналов может содержать такие вызванные микроволнами звуки, которые будут восприниматься человеком осознанно или подсознательно. Изучив множества корреляций между стимулами и реакциям, можно составить таблицы перевода мыслей в последовательности сигналов, вызывающих эти мысли. Подобным же образом, проанализировав реакции человека на набор стимулов, можно создать обучающуюся нейронную сеть для перевода мыслей в последовательности сигналов. Еще более совершенный компьютеризированный прибор должен будет включать автоматические и полуавтоматические операции передачи мыслей и слежения за лучом.

11.1.2.1. Частоты

Наиболее подходящими представляются носители частот в диапазоне 100 МГц — 100 ГГц. Электромагнитные волны в этом диапазоне частот распространяются линейно, их можно сфокусировать, они проникают сквозь воздух и стены зданий и индуцируют токи во внутренних слоях тела человека (рис. 11.3). Для эффективной передачи носители частот должны совпадать с резонансными частотами частей тела, например, определенных нервов.

Теоретические исследования и измерения слышимости микроволн приводят к выводу, что наиболее пригодными для модуляции сигналов в частоты носителя являются частоты в диапазоне 1 Гц — 100 МГц. Например, для преобразования голосовых сигналов в диапазоне слышимости 16 Гц — 20 кГц в последовательность импульсов последние должны содержать компоненты с частотами в области нескольких МГц. Более низкие частоты примерно в диапазоне 1—60 Гц, как известно, влияют на настроение.

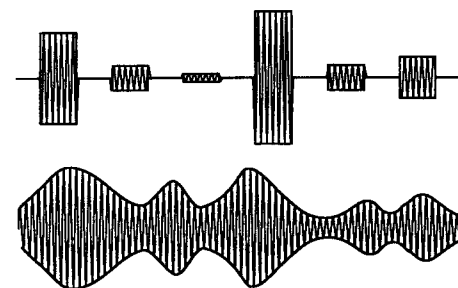


Рис. 11.3. Два примера амплитудной модуляции сигналов. Огибающая сигнала соответствует передаваемому низкочастотному сигналу, который является эффективным, например, в коре головного мозга, внутреннем ухе, акустических нервах или других нервах и обычно имеют частоту 1 Гц — 100 МГц.

11.1.2.2. Источники излучения

Требуемым свойствам луча и диапазону частот удовлетворяют мазеры (квантовые генераторы усиленные при помощи вынужденного излучения микроволн; рис. 11.4), например, мазеры свободных электронов (часто называемые электронными лазерами) и полупроводниковые диодные мазеры (диодные лазеры). Для генерации фокусируемого, модулируемого электромагнитного луча с частотами от нескольких метров до нескольких километров, которые пригодны для передачи, подходящими источниками могут также быть магнетроны, гиротроны², клистроны и сотовые антенны (фазированные антенные сетки).

В зависимости от величины потерь при передаче и от взаимодействия с телом необходимая средняя мощность, приходящаяся на одного индивидуума-адресата, в большинстве случаев должна быть порядка 0,01—10 Вт. Для передачи сквозь стены могут потребоваться более высокие интенсивности, но их надо будет применять с очень большими предосторожностями, дабы не нанести вред как принимающему человеку, так и посторонним лицам, находящимся на пути луча.

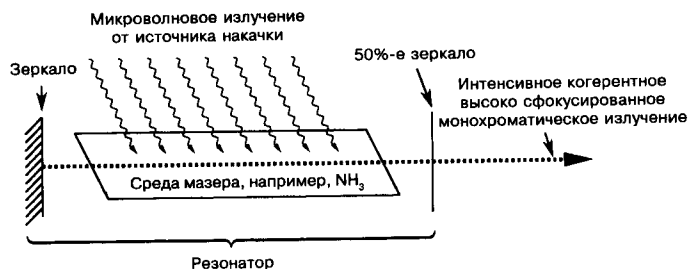


Рис. 11.4. Принцип генерации и усиления электромагнитных волн в мазере. Источник накачки возбуждает специфические линии в среде мазера. При определенных условиях популяция энергетических уровней, генерируемых в молекулах среды мазера, становится инвертированной, т. е. образуется больше молекул в возбужденном метастабильном, чем в основном, состоянии. При таких условиях интенсивность микроволн, проходящих сквозь среду мазера, может резко усиливаться посредством возбужденного излучения. При определенных усилениях и качестве резонатора возникают самоподдерживающиеся колебания, для чего оказывается достаточным начальное спонтанное возбуждение, и никакое дополнительное возбуждение не требуется.

² Gyrotron — гиротрон — мощный усилительный и генераторный прибор миллиметрового диапазона.

11.2. Примеры возможных применений

11.2.1. Автоматические устройства

Рис. 1.5 отражает в общих чертах устройство для передачи мыслей, смонтированное на транспортном средстве. Оно генерирует микроволновый луч, который модулируется соответствующим путем и посылается принимающему человеку. Представленное устройство состоит

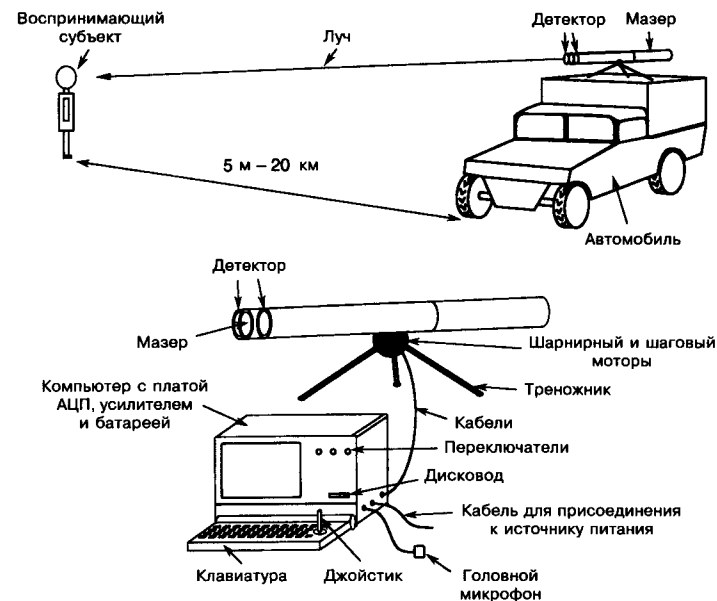


Рис. 11.5. Дистанционная передача мыслей к воспринимающему человеку с помощью модулированного луча микроволн миллиметрового диапазона, генерированных мазером (например, полупроводниковым), установленном на крыше поискового транспортного средства. В одном из режимов голос наблюдателя преобразуется в электрический сигнал и подается в компьютер, где происходит дальнейший процессинг голосовых сигналов. Луч мазера модулируется с помощью этих процессированных сигналов и посылается воспринимающему человеку. Модуляция может включать в себя, например, звуки, действующие на подсознание, осознано воспринимаемые звуки или низкочастотные сигналы, изменяющие настроение. Слежение за воспринимающим человеком может производиться вручную или автоматически. Для обнаружения воспринимающего человека можно использовать микроволновой телескоп или радар.

из лазера для генерации электромагнитного луча, микрофона для введения голосовых сигналов оператором, перезаряжаемого источника энергии и детектора для наблюдения и слежения. Вес устройства составляет примерно 100 кг. Чтобы обеспечить хорошую фокусируемость и достаточное проникновение сквозь воздух, стены зданий и почву, частоты излучения лазера должны быть в диапазоне 1–1000 ГГц. В идеале детектор должен иметь максимальную чувствительность при несущей частоте лазера.

Для передачи мыслей интенсивности микроволновых импульсов в посылаемой последовательности должны коррелировать с интенсивностью звука для некоторых ключевых слов. Микроволновой луч вызывает токи в коре головного мозга принимающего человека, и эти токи изменяют вероятность некоторых мыслей. Прибор может работать автоматически, если для посылки и прослеживания сигналов использовать специальное программное обеспечение. Для создания программного обеспечения, способного генерировать модулированные сигналы, можно использовать большой набор корреляций между стимулами и мыслями. Например, если 100 независимых стимулов вызывают определенную мысль с вероятностью 2%, то совместное использование этих стимулов может вызвать эту мысль с вероятностью 87%. Если, когда это доступно, передавать одну и ту же мысль достаточно долго, то даже при таких низких корреляциях можно получить значимый результат.

11.2.2. Переносные устройства

На рис. 11.6 показано портативное переносное устройства для передачи мыслей, которое состоит из лазера, головного микрофона для ввода голосовых сигналов оператором (который одновременно является и наблюдателем), аккумуляторных батарей и детектора типа, например, микроволновой камеры. Оператор вручную следит за принимающим человеком и посылает либо последовательность сигналов, хранящуюся в компьютере, либо собственное голосовое сообщение, которое тут же модулируется прибором в лазерный луч. Несколько переключателей на электронной аппаратуре позволяют оператору устанавливать разные режимы работы, такие как посылка сохраняемых сигналов, полуавтоматическая настройка интенсивности, тот или иной способ модуляции передаваемых сигналов. В противоположность оглушающим выстрелам из электромагнитного ружья, здесь интенсивность излучения намного ниже и может быть ниже или слегка выше осознанного восприятия. Кроме воспринимаемых и подсознательно воспринимаемых голосов, музыки и ритмов в диапазоне частот выше 16 Гц, можно посылать также частотные ритмы ниже 16 Гц.

С помощью такого устройства можно обеспечить успех важных презентаций. Например, команда экспертов, следя со стороны за выступлением шефа, может в критический момент оказать ему реальную поддержку, посылая ключевые слова, или оказать иную необходимую помощь.

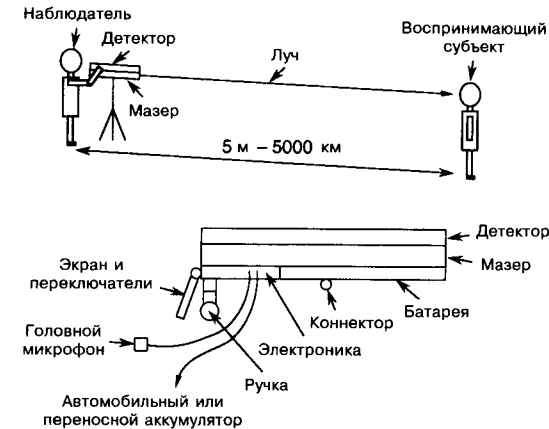


Рис. 11.6. Пример небольшого ручного устройства для передачи мыслей. Оно состоит из лазера, головного микрофона, аккумуляторной батареи и детектора. Устройство может быть присоединено к источнику питания автомобиля или к энергоблоку. Слежение за воспринимающим субъектом может отображаться на экране.

11.2.3. Биомедицинская микроволновая акустика и передача мыслей

Рис. 11.7–11.15 иллюстрируют различные варианты и возможности расположения приспособлений микроволновой акустики и передачи мыслей, которые позволяют достигать различных участков земли. В определенной мере эти приспособления следовало бы привязать к существующим телекоммуникационным сетям (рис. 11.13).

В случае аварии или катастрофы посредством микроволновой акустики и технологии передачи мыслей можно было бы без промедления установить контакты со значительным количеством пострадавших (рис. 11.14). В таких чрезвычайных ситуациях удалось бы сократить количество повреждений, предотвратить панику и мотивационно настроить людей на помощь со стороны спасателей. Необходимые быстрые перемещения луча можно осуществлять с помощью лазеров с модуляторами направления и сотовых антенн.

Потенциально возможной представляется передача мыслей непосредственно от одного человека к другому. Предназначенный к пересылке сигнал переносится от мозга одного человека в память компьютера, где он обрабатывается (процессируется) и передается другому человеку. Обработка сигнала может включать в себя частотный анализ и отбор преобладающих частот. Для передачи могут использоваться

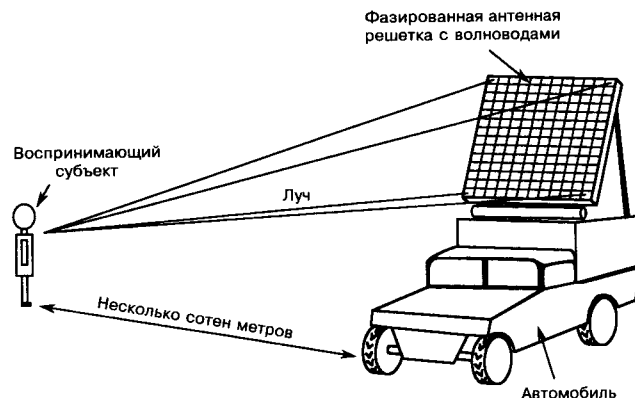


Рис. 11.7. Устройство для передачи мыслей на основе фазированной антенны, установленной на крыше поискового транспортного средства. С помощью такого устройства можно отслеживать воспринимающего человека без механического перемещения антенны, подобно сотовой антенне радара. Для передачи мыслей можно посылать, например, последовательность импульсов, интенсивности которых коррелируют с интенсивностями произносимых слов.

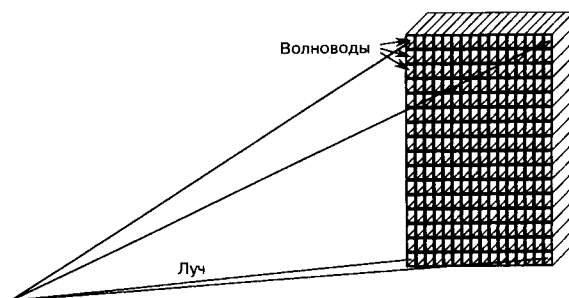


Рис. 11.8. Небольшая фазированная антенная решетка с 16×16 волноводами. Элементами антенны могут быть, например, полупроводниковые диоды. Направление луча изменяется посредством изменения фаз между элементами антенны.

очень низкие или очень высокие неакустические частоты. Таким путем можно, например, передать состояния напряженности или ослабленности, которые резко различаются своими преобладающими частотами мозговой активности. Если посылающим лицом является больной, скажем, человек в коме, то принимающий его сигналы здоровый человек сможет установить с ним принципиально новую форму контакта. Таким методом можно будет оказывать помощь слепым, глухим и немым.

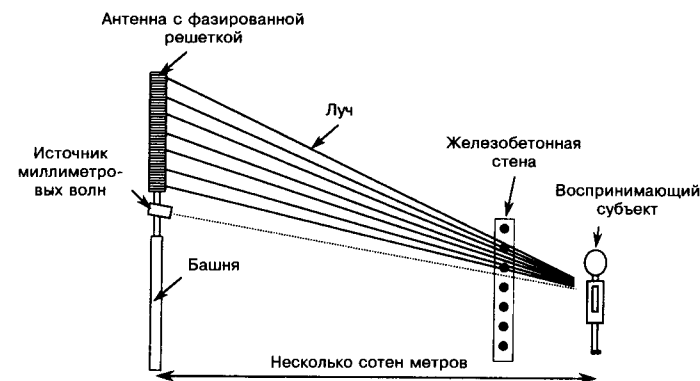


Рис. 11.9. Антенна с фазированной решеткой позволяет передавать мысли и вести наблюдение через железобетонные стены. Благодаря конической геометрии луча, небольшие металлические детали не становятся серьезным препятствием на пути луча.

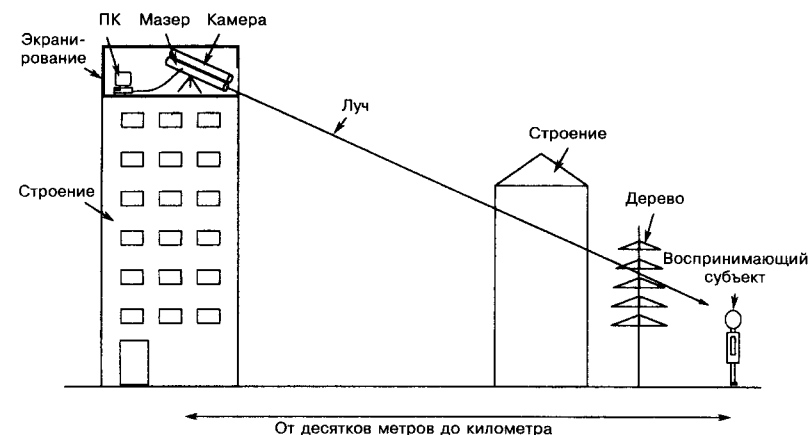


Рис. 11.10. Передача мыслей на большие расстояния с помощью модулированного луча лазера. Камера может, например, регистрировать отраженное излучение лазера. Дальность действия зависит от рассеяния луча и от рельефа местности. Дабы предотвратить нежелательную интерференцию с людьми и электрооборудования, может потребоваться хорошее экранирование комнаты, где находится аппаратура. Передаваемый и принимаемый сигналы способны в определенной степени проникать сквозь деревья и стены из дерева, камня и пластика.

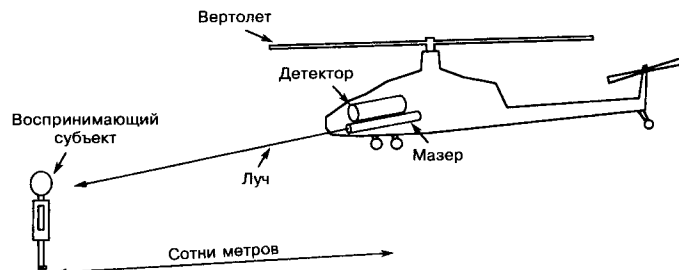


Рис. 11.11. Передача мыслей от самолета, вертолета или беспилотного летательного аппарата с помощью специальным образом модулированного луча электромагнитной энергии. Для надежной передачи может потребоваться хорошая механическая защита передающей аппаратуры от сотрясений.

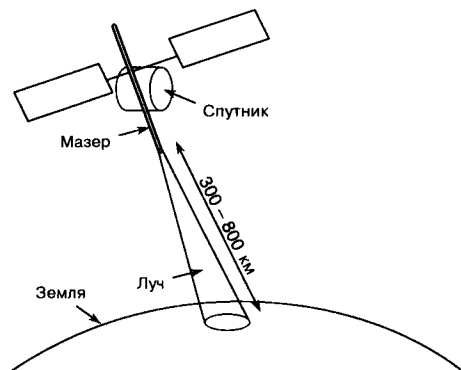


Рис. 11.12. Для передачи мыслей с помощью спутника требуется очень малое рассеяние луча и мощный источник питания. Спутники на низких орбитах смогут за пару минут передать сигналы в некоторую точку на земле без значительного их рассеяния. Серьезной проблемой, однако, может стать обеспечение достаточной мощности и веса передающего устройства.

Другим возможным применением передачи мыслей могут стать прочтение и анализ мыслей человека, ошибочно подозреваемого в совершении преступления, с целью доказательства его невиновности. Простым подходом здесь может оказаться внезапное и подсознательное послание человеку ключевого слова, которое имеет важное значение в контексте преступления. При одновременном наблюдении за реакцией человека подозрение будет доказано или опровергнуто. Передаче ключевого слова может предшествовать подготовительная или активационная фаза, при которой мысли человека можно направить на ключевое событие с помощью подсознательных сигналов. Компьютеризи-

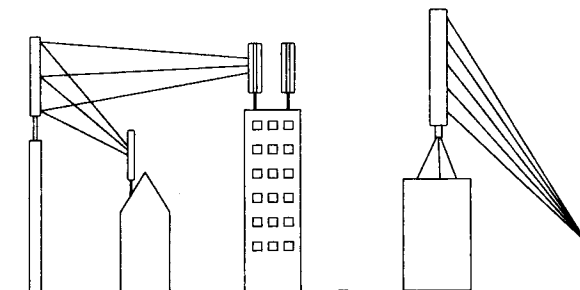


Рис. 11.13. Технология передачи мыслей должна быть совместимой с существующей телекоммуникационной сетью, что даст возможность в развитых промышленных странах использовать для этой техники обычные мобильные телефоны.

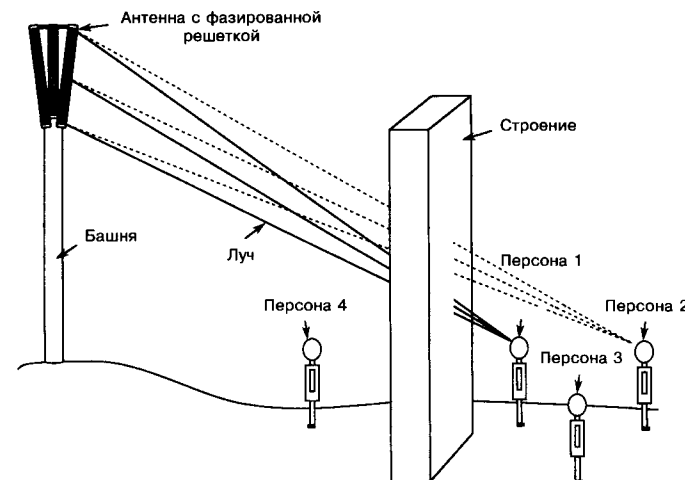


Рис. 11.14. Передача мыслей одновременно к нескольким VIP-персонам с помощью специальным образом модулированных электромагнитных лучей в случае чрезвычайной ситуации. Для улучшения их обнаружения принимающие персоны имеют при себе специальные метки. Передача осуществляется многократно (мультиплексно) и почти одновременно путем быстрого переключения направления лучей от фазированной антенны.

рованная технология передачи мыслей допускает и более изощренные методы. Например, некоторую ключевую информацию можно на бессознательном уровне посылать через определенные периоды времени с варьирующими интенсивностями и вычислять корреляции между посылаемыми сигналами и реакциями принимающего человека.

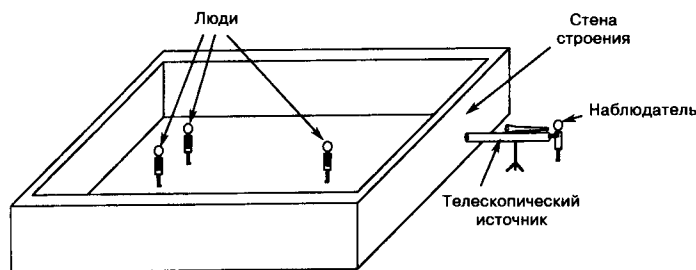


Рис. 11.15. Слуховое восприятие микроволн и передача мыслей в чрезвычайной ситуации с помощью электромагнитного источника с низкой интенсивностью.

Можно ожидать, что микроволновая акустика и технология передачи мысли будут играть все более возрастающую роль в исследованиях мозга, в лечении болезней и для анализа биохимических сетей в мозгу. Например, поскольку модулированное электромагнитное излучение может влиять на мозг и некоторые нейрофизиологические процессы не так, как звуковые волны или видимый свет, то могут возникнуть принципиально новые медицинские применения. Таким образом, передача слышимых микроволн и передача мыслей предоставляют возможность для появления новых методов диагностики, анализа, лечения и профилактики некоторых патологических дефектов в метаболизме мозга, а также будут полезны для влияния на некоторые непатологические дефекты, стрессовые ситуации и, возможно, на потерю некоторых функций мозга. На этом пути передача слышимых микроволн и передача мыслей могут стать не только важным средством коммуникации, но и новым полезным инструментом для познания мозга человека.

Добавленная литература

1. Бинги В.Н. Магнитобиология. Эксперименты и модели. — М.: МИЛТА, 592 стр.
2. Вендик О.Г. Фазируемая антенная решетка — глаза радиотехнической системы. Соросовский образовательный журнал, №2, 1997. С. 115—120. http://www.issep.rssi.ru/pdf/9702_115.pdf <http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/269.html>.
3. Кривин Феликс. Передача мыслей на расстояние и обратно. Авт.сб. «Я угнал Машину Времени». — Ужгород: Карпаты, 1992. <http://lib.ru/PROZA/KRIWIN/kriv27.txt> и http://books.rusf.ru/unzip/add-on/xussr_gk/krivn115.htm.
4. МАГНИТОБИОЛОГИЯ / ЭЛЕКТРОМАГНИТОБИОЛОГИЯ. Физические проблемы магнитобиологии и электромагнитобиологии, электромагнитная биофизика в магнитобиологии <http://www.biomag.info/bookr.htm>.
5. Центр электромагнитной безопасности (ЦЭМБ) <http://www.tesla.ru>.
6. Электромагнитные поля и здоровье человека. Библиографический указатель отечественной литературы. <http://mx.prometeus.nsc.ru/partner/zarubin/emfield.ssi>.

ГЛАВА 12

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биофизические методы являются исключительно важными для дальнейшего понимания биологических процессов. Методы структурного анализа с высочайшей разрешающей способностью, такие как рентгеновская кристаллография и сканирующая зондовая микроскопия в сочетании с кинетическими методами (см. Nölting, 1999b), дают нам истинное понимание биологических процессов на молекулярном и клеточном уровнях. Сравнение протеомных карт здоровых и больных индивидуумов позволяет идентифицировать нарушения механизмов регуляции при болезненных состояниях. В свою очередь это дает возможность индивидуального и высоко эффективного нацеленного воздействия лекарствами. Биофизическая нанотехнология и масс-спектрометрия открывают нам новые удивительные пути как для изучения сложнейших биологических систем, так и для осознанного влияния на них. Биофизическая нанотехнология предоставляет новые подходы для монтажа надежно функционирующих наноструктур, таких как белковые микрочипы, наночастицы, нанопровода и т. п. Масс-спектрометрия и спектрометрия ионной подвижности достигли значительного прогресса в обнаружении ультра-следовых количеств не только химических, но и биологических агентов. Ценность этих достижений трудно переоценить в наш беспокойный век, захлестнутый волной терроризма.

Биофизическое понимание живой природы является решающим для разработки рациональных стратегий влияния (самым ответственным образом) на патологические и непатологические недостатки, стрессовые ситуации и болезненные состояния. На этом пути биофизика может внести решающий вклад в понимание факторов, которые влияют на процветание и эволюцию человеческого общества.

ДОПОЛНЕНИЕ

А.Г. Ульяненок

Использование просвечивающей и растровой электронной микроскопии в биологии и медицине

Современные достижения в электронной микроскопии позволили воплотить в жизнь ряд уникальных разработок, позволяющих существенно расширить применение растровых и просвечивающих электронных микроскопов в биологии и медицине.

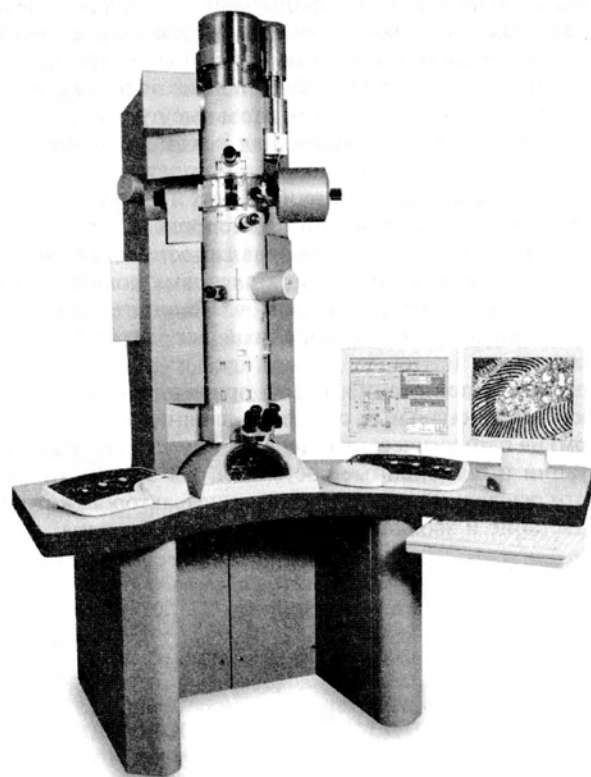


Рис. Д1. Просвечивающий электронный микроскоп ZEISS LIBRA 120 хорошо известен в биолого-медицинских лабораториях мира.

Одной из главных задач, стоявших перед разработчиками оборудования, являлась возможность изучения биологических объектов в их естественном виде, т. е. без специальной консервирующей и контрастирующей подготовки.

Первой «ласточкой», послужившей в дальнейшем своеобразным трамплином для конструкторской разработки, стало создание теории энергетической фильтрации.

Принципы, изложенные в теоретической модели, были взяты на вооружение разработчиками нового оборудования немецкого концерна «Карл Цейсс» и в дальнейшем получили непосредственную реализацию в нескольких сериях просвечивающих электронных микроскопов «Карл Цейсс», предлагаемых сегодня на рынке аналитического оборудования (рис. Д1).

Просвечивающая электронная микроскопия

Поскольку у специалистов-пользователей электронной микроскопии нередко возникают вопросы сравнения и выбора моделей от разных производителей, мне хотелось бы уделить внимание некоторым существенным особенностям именно оборудования концерна «Карл Цейсс».

Существует как минимум три критерия (при прочих равных), на которые следует обратить внимание: 1) базовые характеристики прибора, 2) базовая и рекомендуемая конфигурации и 3) возможность дальнейшего оснащения или модернизации оборудования.

С этой точки зрения цейссовские микроскопы заслуживают пристального внимания.

1) базовые характеристики (такие как пространственное разрешение, диапазон увеличений, стандартные режимы работы) — во многом превосходят аналоги других производителей.

2) уже в базовой конфигурации — прибор решает все возможные в просвечивающей микроскопии задачи, включая химический анализ. Вакуумная система полностью сухая (безмасляная), с отдельной высокоскоростной откачкой. Многие функции имеют автоматическую настройку, что во многом снижает требования к оператору микроскопа.

3) Дополнительная оснастка — энерго-дисперсионный рентгеновский спектрометр, томография, дифракция, цифровые камеры сверхвысокого разрешения, ж/к пластины, крио- и нагреваемые модули, сканирующие модули и детекторы.

Ниже мы рассмотрим базовые комплектации микроскопов ZEISS LIBRA 120 и ZEISS LIBRA 200 FE и особенности входящего в их состав оборудования (диапазон увеличений от $7\times$ до $700\,000\times$).



Рис. Д2. Профессор Август Кёлер.

применяют и второе название — система освещения по Кёлеру) была внедрена в электронных микроскопах более 20 лет назад и сразу выдвинула эту технологию освещения на передовые позиции (рис. Д3).

Следующей вехой, на которой мы остановимся подробнее, стала реализация в электронном микроскопе принципа энергетической фильтрации электронов.

Одной из особенностей электронной микроскопии является то, что электроны луча могут взаимодействовать с исследуемым образцом. При взаимодействии электроны могут испытать упругие и не упругие столкновения и, таким образом, изменять направление движения или отдавать (терять) часть своей первоначальной энергии.

Наибольший интерес в нашем случае представляет взаимодействие с потерей энергии, поскольку существует известная зависимость количества переданной (или потерянной) электроном луча энергии от атомного номера химического элемента, с которым произошло столкновение.

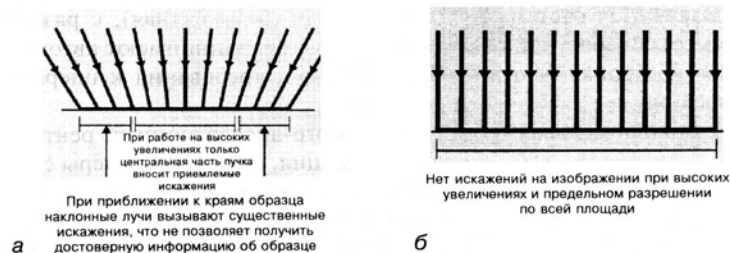


Рис. Д3. а — система освещения в стандартном ПЭМ; б — освещение по Кёлеру.

Небольшой экскурс в историю.

Фирма «Цейсс» была основана более 150 лет назад и была в то время единственной, кто применил научный подход при проектировании и создании исследовательских оптических систем. Вся история мировой науки с тех пор сопровождается оптическим оборудованием «Карл Цейсс». И неудивительно, что большое количество фундаментальных открытий было сделано именно на этом оборудовании.

Многие из разработок, лежащих в основе световой микроскопии, были в дальнейшем использованы в просвечивающих электронных микроскопах фирмы.

Так, система освещения образца параллельным пучком лучей, разработанная проф. Августом Кёлером (рис. Д2) (поэтому часто

Знание этой зависимости и приборная реализация метода фильтрации электронов по энергиям позволила получить и развить два важнейших направления в просвечивающей электронной микроскопии — это спектроскопия энергетических потерь электронов, с помощью которой исследователи могут проводить высокоточный химический анализ и получать карты распределения химических элементов на нанометровом уровне, и, второе, управлять контрастированием изображений неокрашенных и нефиксированных срезов за счет удаления или коррекции шумового сигнала, а также с использованием принципа выделения требуемого сигнала.

Рассмотрим подробнее, какие взаимодействия испытывают электроны луча и образца в процессе проведения исследования.

Из рис. Д4 и Д5 видно, что упруго рассеянные электроны могут быть отсеяны объективной диафрагмой, что собственно, и происходит на практике.

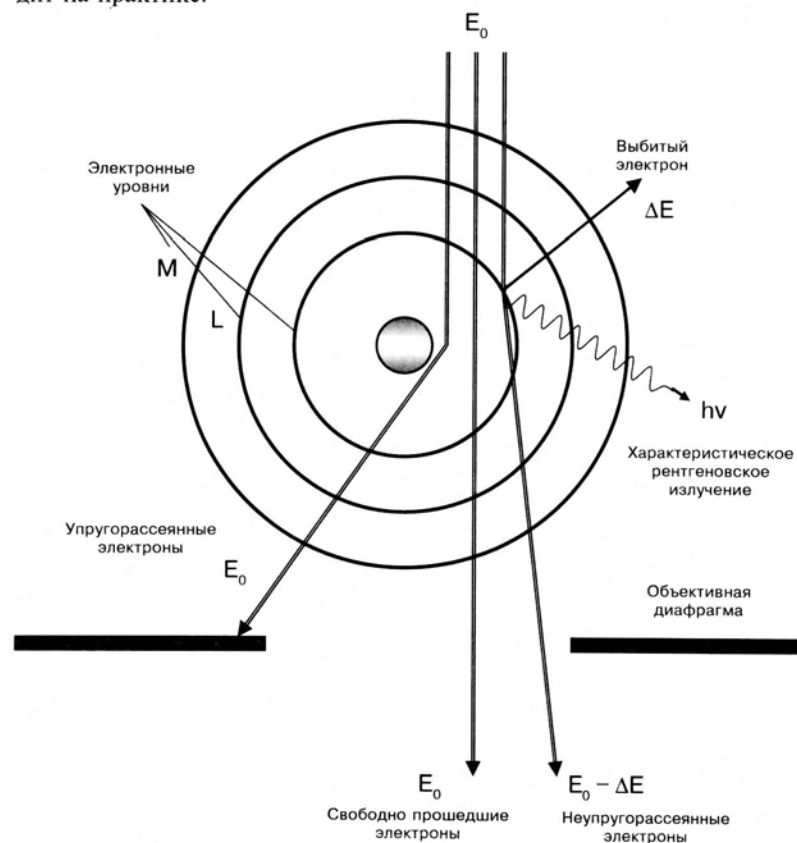


Рис. Д4.

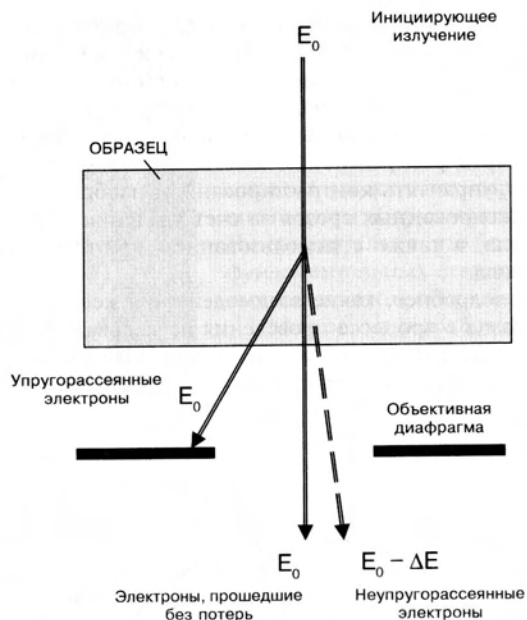


Рис. Д5.

Электроны, прошедшие образец, и электроны, испытавшие неупругое взаимодействие с атомом образца, фокусируются объективной линзой. Из рис. Д6 видно, что наличие в прошедшем пучке электронов, испытавших неупругое взаимодействие, вносит хроматическую aberrацию, т. к. эти электроны отдали часть своей первоначальной энергии на взаимодействие с веществом образца. Эти электроны вносят искажения в конечное электронное изображение, наблюдаемое в виде нечеткости и размытости элементов изображения, т. к. плоскость их фокусирования лежит выше плоскости фокусирования электронов, прошедших образец без взаимодействия.

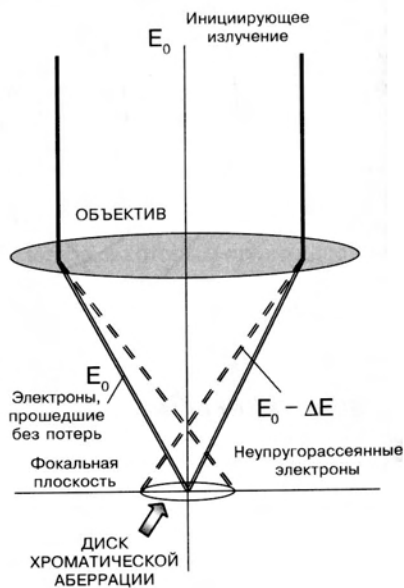


Рис. Д6.

Для устранения искажений получаемого изображения в оптическую систему электронного микроскопа была введена варьируемая щелевая диафрагма, позволяющая тонко «вырезать» шумовые участки спектра или, в зависимости от конкретной задачи исследования, вырезать нужный энергетический спектр для получения электронно-спектроскопического изображения.

Таким образом был реализован принцип энергетической фильтрации — селектирование электронного сигнала по углам рассеяния электронов и последующее селектирование электронов по их энергиям (рис. Д7).

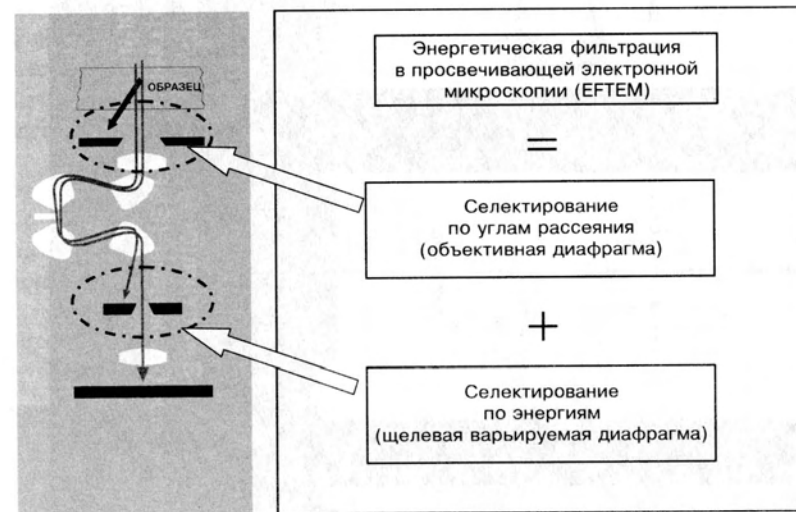


Рис. Д7.

Используя этот принцип, возможно получить три типа электронного изображения (рис. Д8):

1. Глобальное электронное изображение, создаваемое электронами, не испытавшими взаимодействия и неупругостолкнувшимися электронами.
2. Эластичное изображение, создаваемое только электронами, не испытавшими взаимодействия (т.е. энергетические потери = 0 эВ).
3. Электронно-спектроскопическое изображение, создаваемое только неупругостолкнувшимися электронами.

Выдающимся достижением «Карл Цейсс» явилось то, что энергетический фильтр удалось встроить в электронно-оптическую колонну микроскопа (рис. Д9).

Во-первых, была использована симметричная схема его реализации — фильтр не вносит никаких искажений в проходящий сигнал и

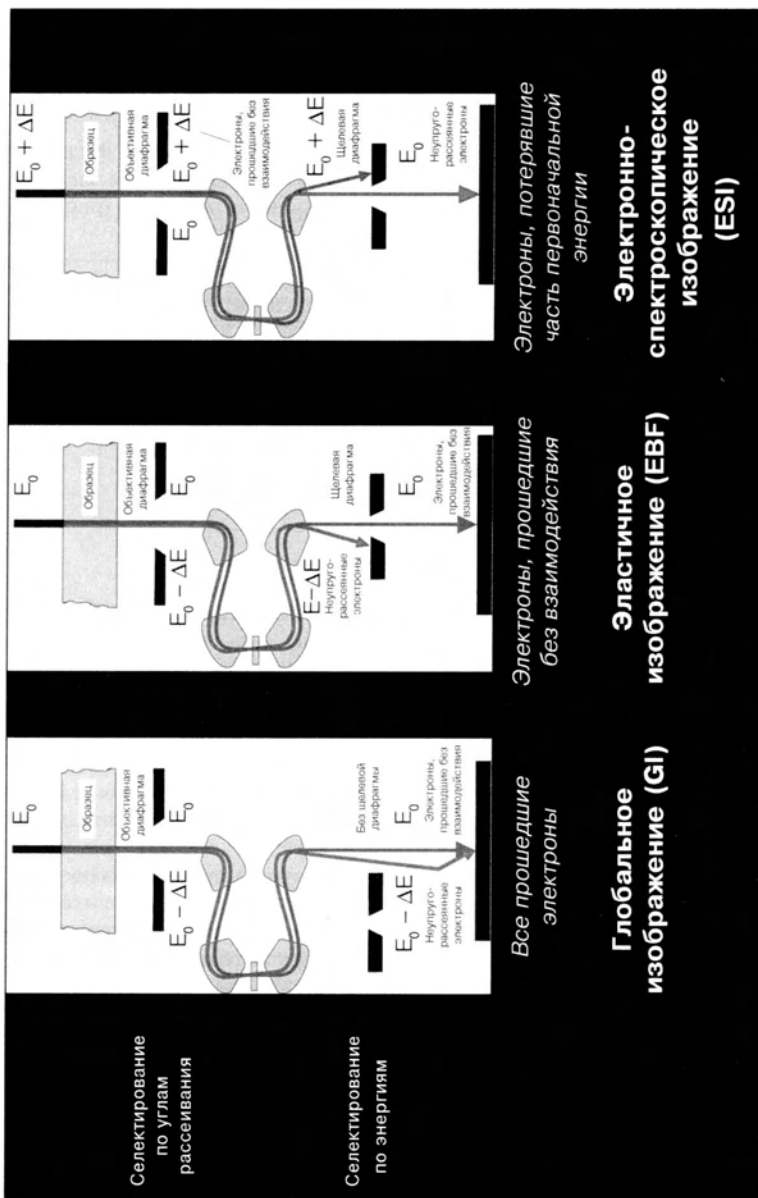


Рис. Д8.

не влияет на увеличение. Передача сигнала осуществляется по принципу 1 : 1.

Во-вторых, такой тип фильтра настраивается единожды при изготовлении микроскопа (т. е. в заводских условиях), и для пользователя нет никакой необходимости и трудности его последующей настройки (что является отличительной чертой всех остальных типов фильтров в моделях других производителей).

В-третьих, расположение фильтра в ходе луча и до плоскости получения изображения позволяет осуществлять одновременно несколько важных исследовательских операций — например, получать высококонтрастные эластичные изображения и электронно-спектроскопические изображения с учетом химического состава образца, что в принципе невозможно, если фильтр устанавливается в плоскости получения изображения.

Как видно из рис. Д10 расположение магнитных призм напоминает греческую букву омега.

Это сходство дало название фильтру — омега-фильтр. В дальнейшем было разработано еще несколько конструкций, последней из которых стал мандолин-фильтр.

Одним из результатов работы такой системы является также возможность изучения неокрашенных нефиксированных срезов.

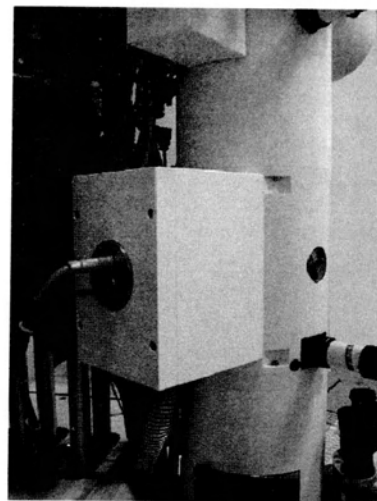


Рис. Д9. Фильтр в колонне микроскопа.

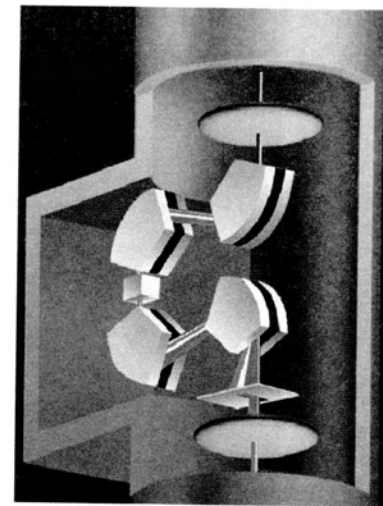
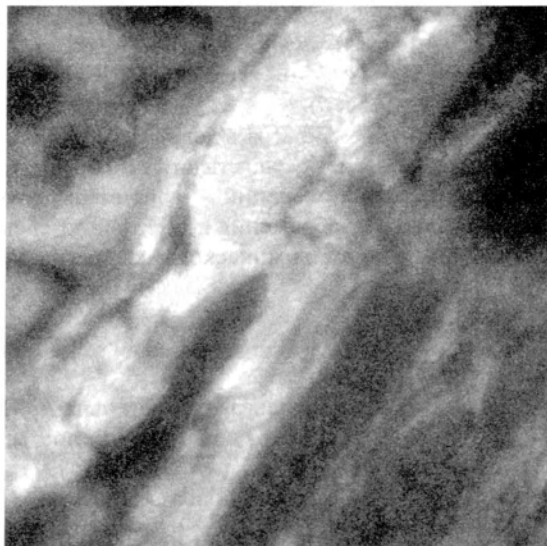


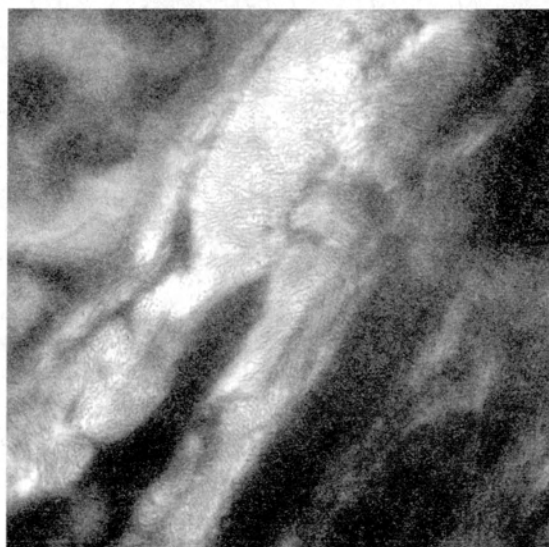
Рис. Д10. Схема работы фильтра.

Для большей наглядности продемонстрируем это на одном из образцов.

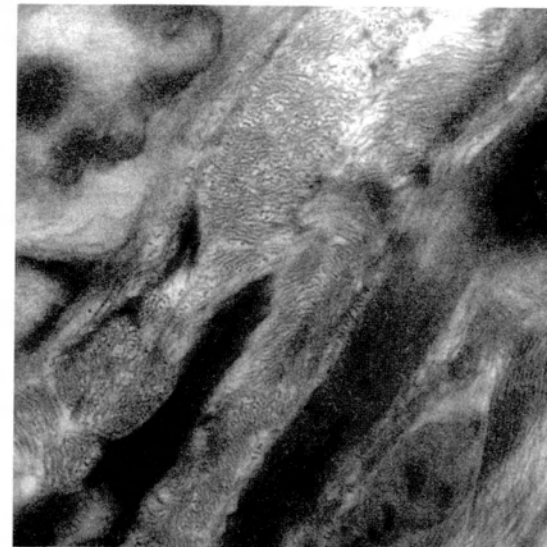
1) так выглядит нефильтованное глобальное изображение:



2) тот же срез — эластичное изображение:

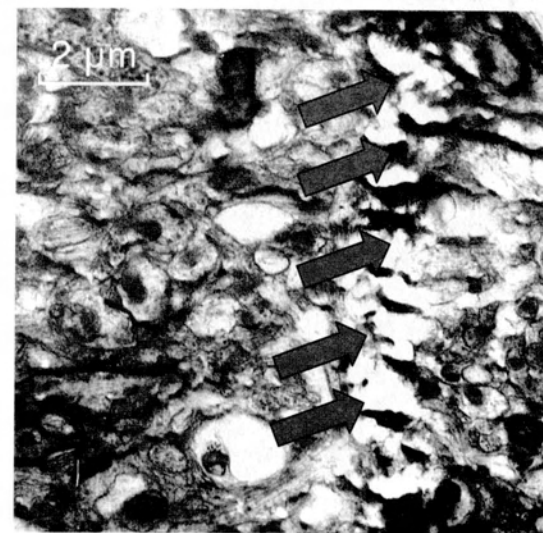


3) электронно-спектроскопическое изображение, полученное в области потерь 100 эВ:



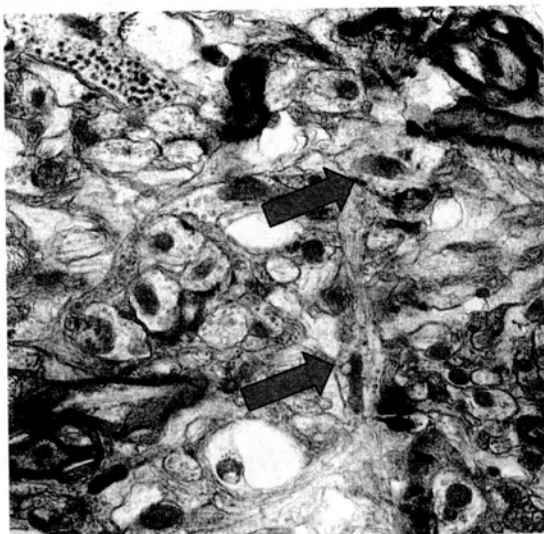
Еще один пример — срез переднего мозга карпа (диаметр образца 0,05 мм):

1) глобальное изображение — такое, которое вы получили бы без фильтрации:



В области, обозначенной стрелками, видны задиры и артефакты, оставленные ножом микротом.

2) тот же образец — электронно-спектроскопическое изображение, полученное с помощью омега- фильтра:



Область механических артефактов отсутствует! Изображение имеет лучший контраст и высокую детализацию.

Принцип фильтрации позволяет получать также и высококонтрастные изображения срезов, не подвергавшихся какой-либо специальной обработке.

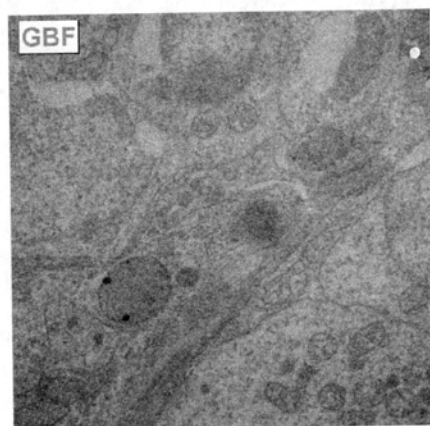


Рис. Д11. Глобальное изображение (присутствует хроматическая абберация).

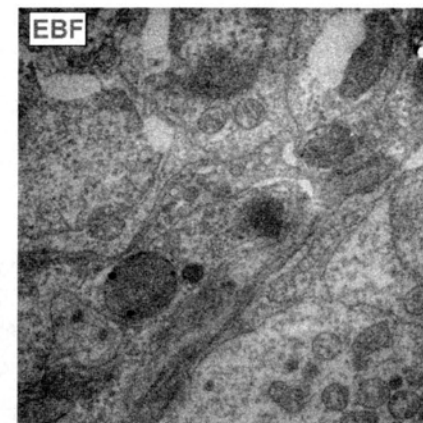


Рис. Д.12. Электронно-спектроскопическое изображение (хроматическая абберация убрана).

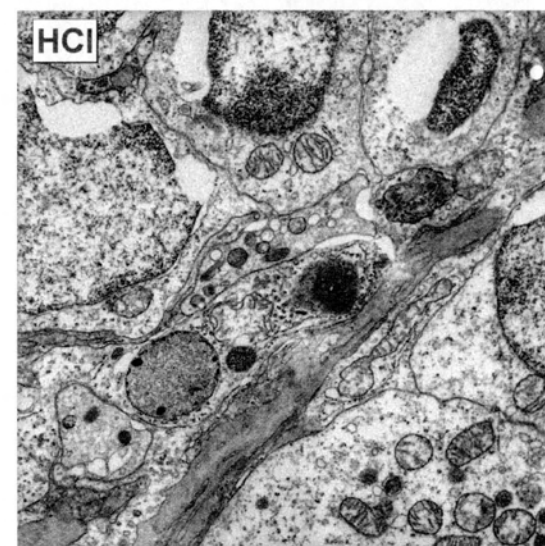


Рис. Д13. Высококонтрастное фильтрованное электронно-спектроскопическое изображение.

Современные методы анализа и обработки изображения в совокупности с возможностями, заложенными в просвечивающих электронных микроскопах «Карл Цейсс», позволяют получать очень наглядные и информативные изображения.

В частности, как уже говорилось выше, фильтрация позволяет выделять участки изображения, в структуре которых присутствуют атомы того или иного химического элемента. Исключительно материаловедческая, в недалеком прошлом, задача находит все большее и большее применение у биологов и позволяет им, не используя никакого дополнительного аналитического оборудования, получать данные о химическом составе образцов и локализации тех или иных химических элементов на клеточном или субклеточном уровне.

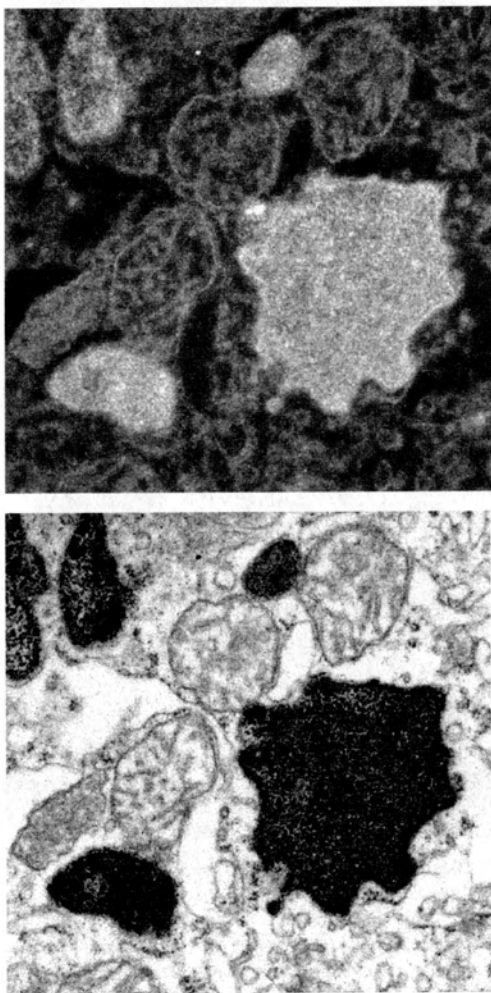


Рис. Д14. Прямое и инвертированное изображения биологического образца.

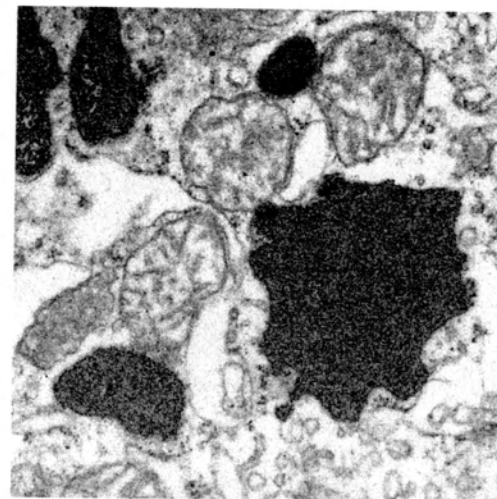


Рис. Д15. Задача — построить карту распределения железа.

Практическое решение этой задачи — темным цветом выделены участки с содержанием железа (фильтрованное изображение с учетом данных энергетических потерь).

Более наглядный пример — сочетание карт распределения нескольких элементов.

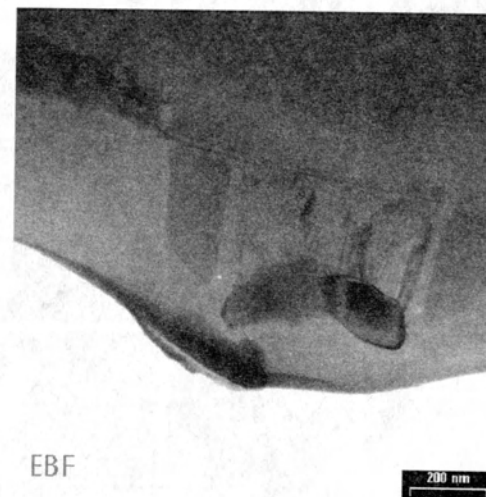


Рис. Д16. Первоначальное изображение.

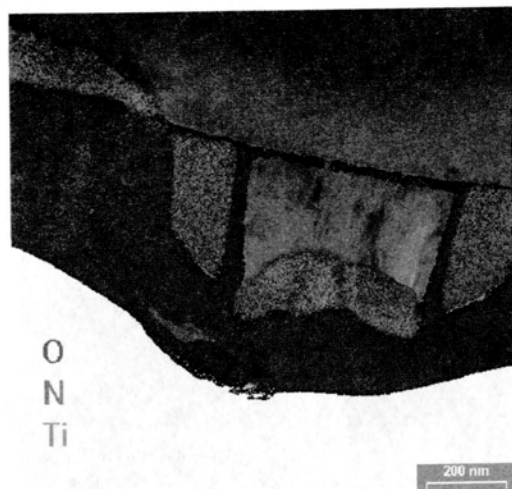


Рис. Д17. С учетом химического состава.

Каждый из микроскопов комплектуется одной или несколькими цифровыми камерами высокого разрешения, пришедшими на замену фотопластинкам. Отсутствует необходимость в расходных фотоматериалах, изображения получают и исследуют в режиме реального времени.

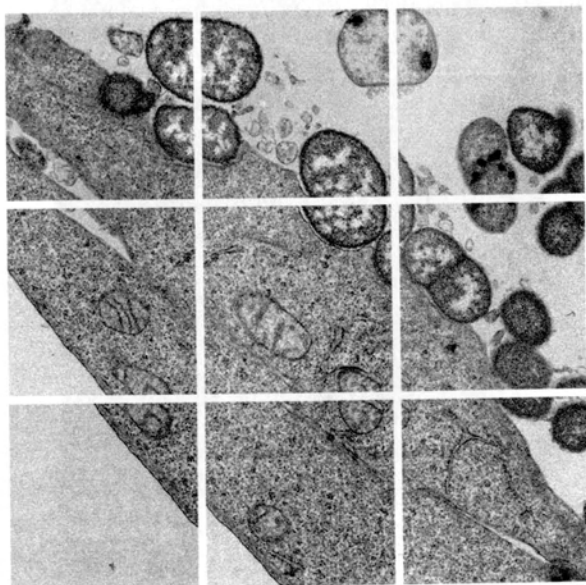


Рис. Д18. Изображения участков.

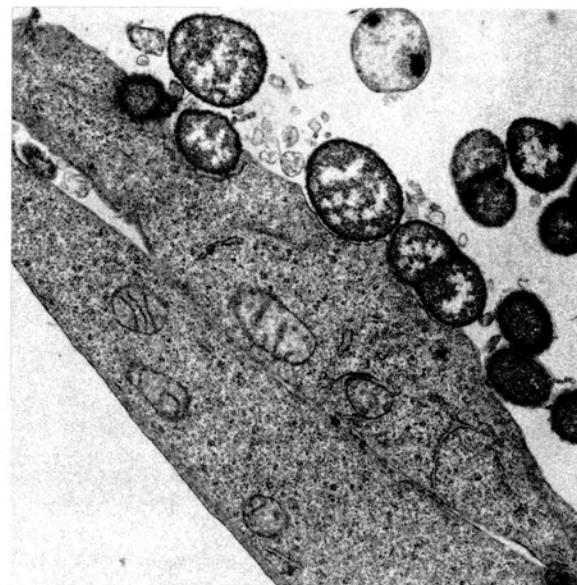


Рис. Д19. Финальное изображение.

Растровая электронная микроскопия

В последнее время все больший интерес в научной среде проявляется к возможностям растровой электронной микроскопии и ее использованию в биологии.

Растровый микроскоп, несмотря на отличный от просвечивающей микроскопии принцип получения изображения, тем не менее, интересен тем, что позволяет изучать биологические объекты больших размеров — до нескольких десятков мм в диаметре и имеющих большую толщину. Современное решение конструкции растровых микроскопов позволяет изучать объекты без какой-либо пробоподготовки, вплоть до свежесрезанных растений, насекомых или животных тканей — т. е. объемных, непроводящих и влажных объектов, в недалеком прошлом запрещенных к изучению с помощью электронной микроскопии.

Более того, в ряде экспериментов сейчас возможно изучение поведения того или иного объекта в динамике — например, объекта, помещенного в водную среду.

Такое стало возможным благодаря использованию систем с регулируемым давлением в диапазоне высокий вакуум — низкий вакуум — сверхнизкий вакуум — естественная среда и использованию специально разработанных детекторов.



Рис. Д20. ZEISS EVO 50 EP — растровый микроскоп № 1 для решения задач в биологии и медицине (увеличение от $5\times$ до $10^6\times$).

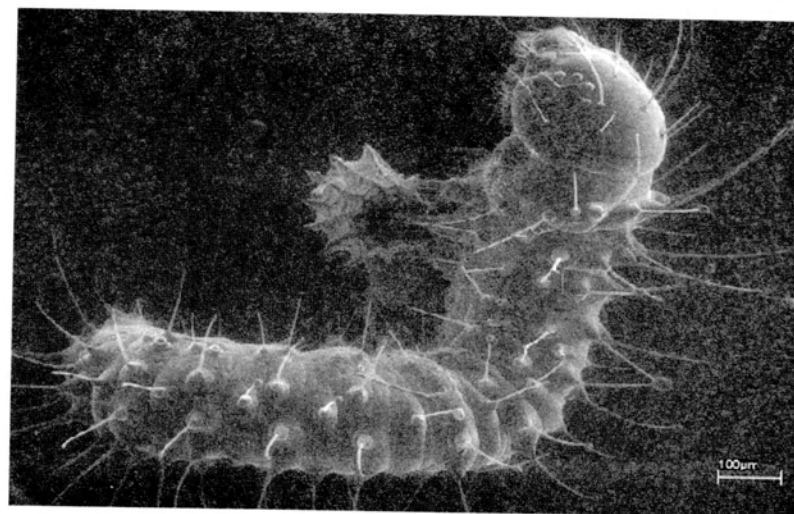


Рис. Д22. Гусеница на влажном листе.

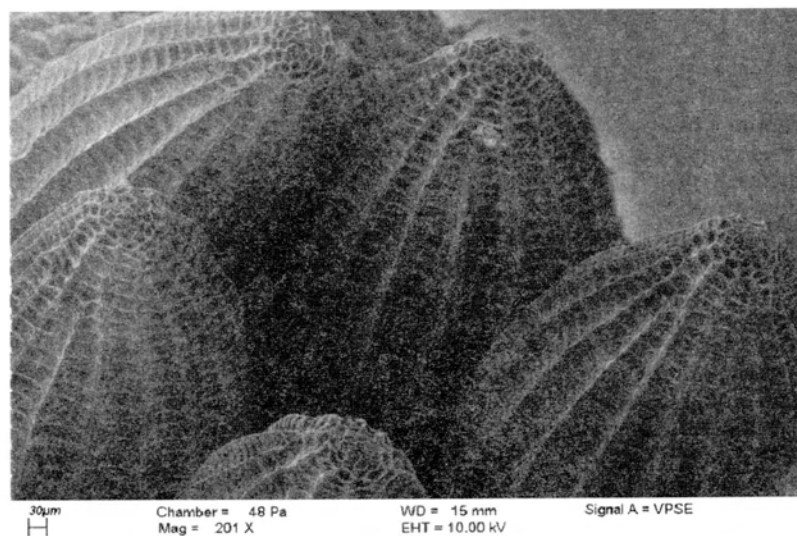


Рис. Д21. Вот как, например, выглядит кладка бабочки.

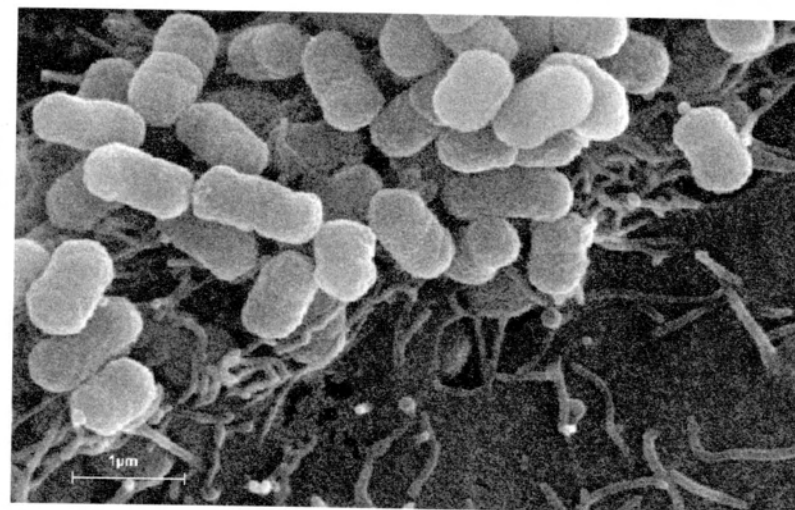


Рис. Д23. E-COLI

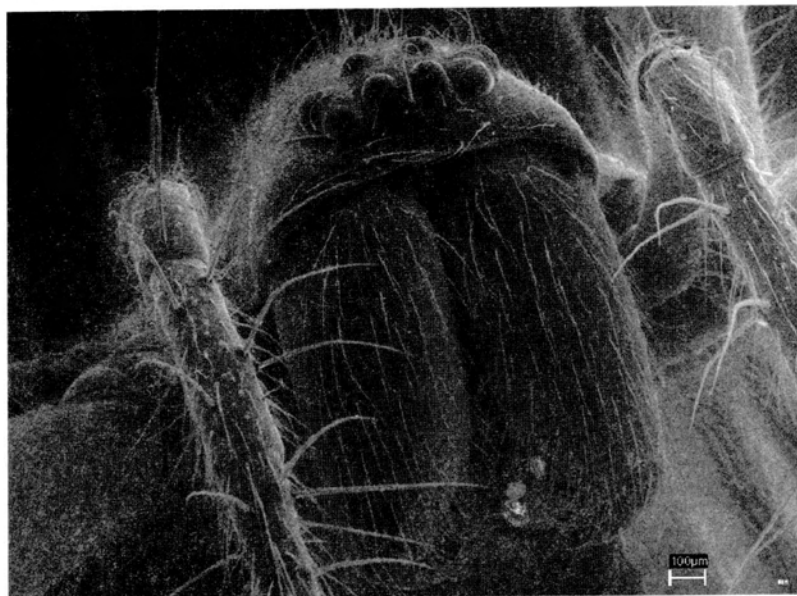


Рис. Д24. Паук.

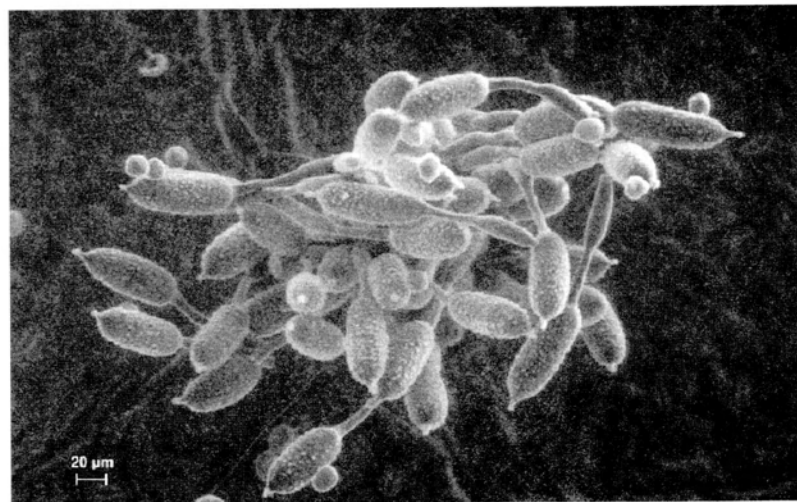


Рис. Д25. Грибок.

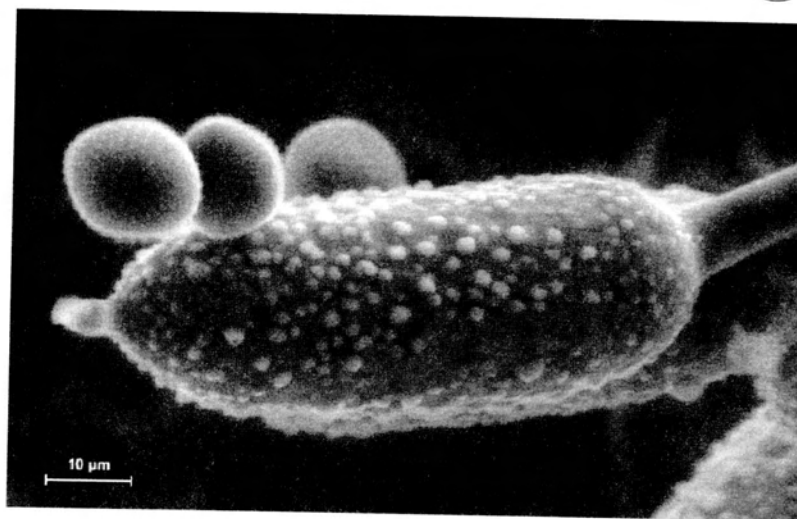


Рис. Д26.

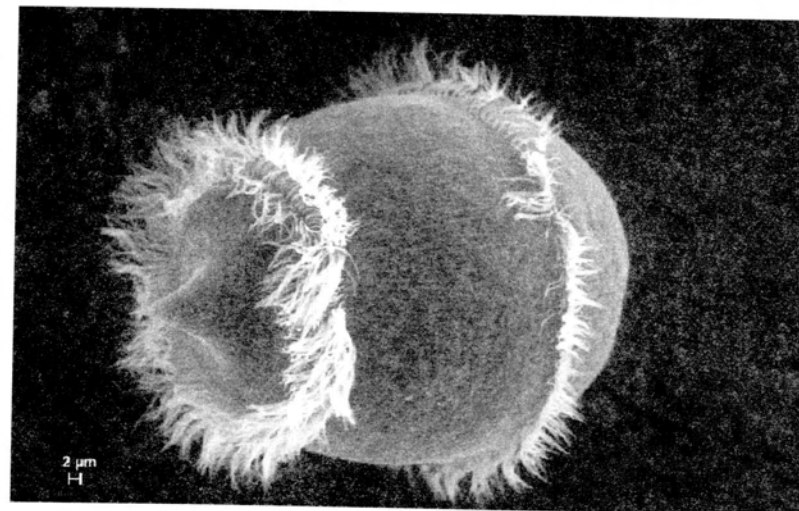


Рис. Д27. Ресничное.

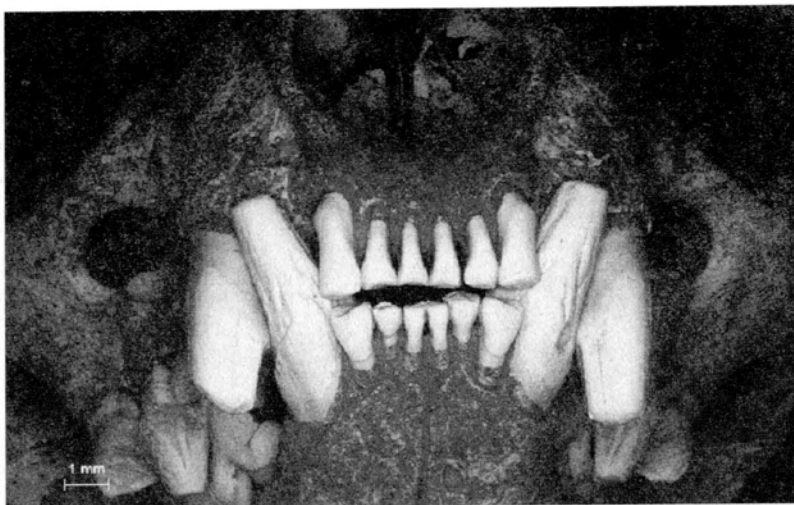


Рис. Д28. Череп норки.

При изучении объемных образцов в современной растровой микроскопии возможно получение точных данных об их размерах — задача, часто стоящая перед физиологами при изучении пылевых зерен.

При использовании электронной микроскопии — в диапазонах одинаковых со световой микроскопией увеличений — получаемое электронное ч/б изображение чаще всего бывает более информативным даже в сравнении с цветным изображением, полученным со светового микроскопа.

Растровые и просвечивающие электронные микроскопы «Карл Цейсс» оснащаются любым дополнительным аналитическим оборудованием, что может существенно расширить круг решаемых задач. Как правило, это оборудование для проведения химического анализа, а так же специальное оборудование для изучения тех или иных свойств исследуемых образцов.

Электронная микроскопия от Carl Zeiss

ZEISS CrossBeam 1540XB EsB - двухлучевой растровый электронный микроскоп. Признан лучшим продуктом 2004г. в своем классе

- легендарная автоэмиссионная электронно-оптическая колонна GEMINI (разрешение до 0,8 нм)
- специальный детектор обратно-рассеянных электронов сверхвысокого разрешения (до 1,5 нм)
- ионная пушка
- режимы: электронное изображение, ионное изображение, комбинированное изображение
- отображение работы ионного пучка (резка, травление) в реальном времени в режиме электронного изображения
- полностью безмасляная вакуумная система
- возможность установки квадрупольного масс-спектрометра
- режим подготовки образцов для просвечивающей микроскопии
- микроманипулятор
- возможность установки шлюза с автоматической подачей серий образцов
- возможность установки беззотного ЭДС
- встроенная система виброзащиты
- возможность установки литографического модуля Raith и столика с точностью перемещения 2 нм



- видеозапись динамических процессов

ООО «Карл Цейсс»

www.zeiss.ru

105 005 Москва
Денисовский пер., 26
Тел.: (095) 771 64 90
Факс: (095) 771 64 90
E-mail: office@zeiss-msk.ru



We make it visible.

Заявки на книги присылайте по адресу:
125319 Москва, а/я 594
Издательство «Техносфера»
e-mail: knigi@technosphaera.ru
sales@technosphaera.ru
факс: (095) 956 33 46

В заявке обязательно указывайте
свой почтовый адрес!

Подробная информация о книгах на сайте
<http://www.technosphaera.ru>

ГПН ОЦ Московский Дом Книги
Нолтинг Новейшие мет
оды исслед. биосистем
484355 Цена: 154.00
20829701048435500020

Б. Нолтинг Новейшие методы исследования биосистем

Компьютерная верстка — Н. А. Попова
Корректор — Л. Г. Циферова
Дизайн книжных серий — С. Ю. Биричев
Ответственный за выпуск — Л. Ф. Соловейчик

Формат 84×108¹/₃₂. Печать офсетная.
Гарнитура Ньютон.
Печ. л. 16. Тираж 3000 экз. Заказ № 766.
Бумага офсетная №1, плотность 65 г/м².

Издательство «Техносфера»
Москва, Лубянский пр-д, 27/1

Диапозитивы изготовлены ООО «Европолиграфик»
Отпечатано в ОАО «Чебоксарская типография №1»,
428019 г. Чебоксары, пр. И. Яковлева, 15

Электронная микроскопия от Carl Zeiss

ZEISS EVO50EP - уникальный электронный растровый микроскоп для био-медицинских исследований, а также для работы с любыми непроводящими, влажными, пористыми, нефте- и масло-содержащими образцами и водными растворами.

- 
- большая рабочая камера и предметный столик
 - возможность работы с образцами размером 250x180x250мм и весом до 5 кг
 - сухая откачка
 - режимы: высокий вакуум, низкий вакуум, сверхнизкий вакуум, естественная среда
 - столик пельтье
 - катоды W и LaB6
 - микроанализ (ЭДС и ВДС) в любом режиме вакуума
 - возможность установки рентгено-флуоресцентного спектрометра, детектора дифракции отраженных электронов, системы катодoluminesценции, специальных столиков и держателей, литографического модуля Raith, столика с точностью перемещения 2 нм
 - видеозапись экспериментов в динамике
 - мультязычный управляющий интерфейс (включая русский язык)

ООО «Карл Цейсс»

www.zeiss.ru

105 005 Москва
Денисовский пер., 26
Тел.: (095) 771 64 90
Факс: (095) 771 64 90
E-mail: office@zeiss-msk.ru



We make it visible.