

## **ПРАКТИКО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ КУРС «СПЕКТРАЛЬНО-ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИООБЪЕКТОВ»**

**Коваленко Е.И., Хмельницкий А.И.**

*Белорусский государственный университет,  
Минск, Беларусь, kavalenka@bsu.by*

При подготовке специалистов наряду с теоретической подготовкой важное внимание должно уделяться получению студентами практических навыков. Освоение современных аналитических методов, понимание принципов функционирования физического оборудования, постановка экспериментов, применение на практике знаний, полученных по различным теоретическим курсам, способствует закреплению и более глубокому пониманию материала, созданию более целостной картины о направлениях исследований в биофизике и смежных дисциплинах. Спецкурс «Спектрально-физические методы анализа биообъектов» включает 20 часов лекций и 200 часов практикума у студентов 4-го курса физического факультета, специализирующихся по биофизике. Данный курс является углублением базовых курсов: «Оптика», «Атомная и молекулярная физика» «Спектроскопия сложных молекул», «Молекулярная биофизика», «Физиология человека и животных». Программа курса охватывает следующие разделы.

Раздел «Спекрофотометрический анализ в биофизике» включает изучение принципов формирования электронных спектров поглощения сложных молекул, обсуждается соотношение спектров с химической структурой молекул, акцентируется внимание на свойствах  $\pi$ -сопряженных линейных и ароматических систем. Рассматриваются основные хромофоры в биологических системах (аминокислоты, белки, азотистые основания, витамины, порфирины), уделяется внимание исследованиям пространственной структуры биополимеров. Обсуждается использование явления плазмонного резонанса для изучения малых количеств веществ. По разделу выполняются следующие лабораторные работы:

1. Графический метод спекрофотометрического определения концентрации веществ. Отклонение от закона Бугера-Ламберта-Бера.
2. Количественный спекрофотометрический анализ смесей поглощающих веществ. Определение наличия примесей, обнаружение химических превращений веществ.

3. Учет рассеяния на частицах при проведении спектрофотометрического анализа. Определение концентрации витамина В<sub>2</sub> в мутных средах. Определение содержания гемоглобина в эритроцитах с помощью спектрофотометрического анализа.

4. Электронные спектры поглощения аминокислот и белков. Исследование пространственной структуры белков титрованием по тирозину.

5. Спектры поглощения хромопротеинов. Влияние простетической группы на спектральные свойства белка, исследование взаимодействия гемовых белков (гемоглобин, пероксидаза хрена) с лигандами.

6. Электронные спектры поглощения нуклеиновых кислот. Гипохромизм. Кривые плавления ДНК.

Раздел «Фотолюминесцентный анализ биообъектов» посвящен рассмотрению люминесцентных свойств аминокислот и пептидов, анализу пространственной структуры белков по люминесценции триптофанилов, использованию явлений миграции энергии и тушения люминесценции для оценки конформационной лабильности белков, межмолекулярных взаимодействий, анализа фотохимических процессов, динамики клеточных структур. Большое внимание уделяется методу флуоресцентных зондов в исследовании структурных и динамических характеристик ДНК, белков, мембран, процессов активации клеток, внутриклеточной подвижности. Рассматриваются принципы проточной цитометрии, конфокальной микроскопии, применение цветных флуоресцирующих белков, флуоресцентных белков-«таймеров». Лабораторные работы по разделу включают:

1. Основные закономерности флуоресценции.
2. Поляризация люминесценции. Вращательная деполяризация, формула Левшина-Перрена
3. Флуоресцентный анализ аминокислот и белков. Миграция энергии.
4. Тушение флуоресценции. Определение пространственной структуры биополимеров с использованием тушителей 2-го рода.
5. Метод флуоресцентных зондов в исследовании биообъектов.

В разделе «Хемилюминесценция» (ХЛ) дается представление о свободных радикалах, биохемилюминесценции, активированной ХЛ клеток, железо- и пероксидазо- индуцированной ХЛ, ХЛ при перекисном окислении липидов, ХЛ хлорофилла. Рассматриваются ХЛ методики исследования антиоксидантных свойств веществ, биолюминесцентные тест-наборы с использованием люциферазы-люциферина, кальций-активируемые фотопротеины. Лабораторные работы, выполняемые по разделу:

1. Хемилюминесцентное определение следовых количеств гемоглобина. Хемилюминесцентный анализ кинетики пероксидазных реакций.

2. Процессы образования активных кислородных метаболитов в активированных клетках: хемилюминесцентный метод исследования.

В разделе «Колебательная спектроскопия» рассматриваются возможности применения ИК-спектроскопии и комбинационного рассеяния для анализа структуры и динамики биомолекул, изучаются возможности гигантского комбинационного рассеяния, фемтосекундной колебательной спектроскопии, фурье ИК-спектроскопии (FT-IR), фемтосекундной стимулированной рамановской спектроскопии (FSRS), конфокальной рамановской и ИК-микроскопии. Имеющаяся на кафедре биофизики приборная база позволяет проведение лабораторных работ:

1. ИК-спектроскопия аминокислот и белков. Определение вторичной структуры белков.

2. Конфокальная рамановская микроскопия биообъектов.

Раздел «Круговой дихроизм и дисперсия оптического вращения. Магнитная оптическая активность» посвящен анализу возможностей для исследования конформации биополимеров при связывании с лигандами, предоставляемых при изучении явлений оптической активности в УФ-области спектра, изучении колебательного кругового дихроизма и т.д.

Раздел «Анализ дифракции и рассеяния излучения в исследовании размеров и формы биообъектов» включает применение светорассеяния для анализа размеров, числа частиц, процессов агрегации, деформации, рассмотрение методов динамического рассеяния света, турбидиметрии, нефелометрии, лазерной дифракции. Лабораторные работы:

1. Турбидиметрический анализ процессов агрегации клеток крови.

2. Определение размеров клеток крови методом малоуглового светорассеяния.

3. Изучение кинетики гемолиза эритроцитов.

В разделе «Спектроскопия ЭПР и ЯМР в биофизике» изучаются возможности применения спиновых зондов для анализа структурно-функциональных параметров мембран, измерения рН в клетках и органах, определения количества SH-групп в белках, регистрации свободных радикалов в биосистемах, изучения топографии и структурных перестроек белков, ЯМР-спектроскопия белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов, ЯМР-томография, пространственно-селективная спектроскопия ЯМР.