

Інструментальні методи в біології: збірник задач і вправ

Збірник створено для допомоги слухачам онлайн-курсу "Мікроскопія та інструментальні методи", який проводився в рамках проектів профінансованих Німецькою службою академічних обмінів (DAAD) у 2023-2025 р.р.

Лекційний матеріал можна завантажити на сайті проекту

<http://lifesciencescourse.org/>

Автор посібника –

Володимир Швадчак

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

ЗМІСТ

1.1.	Абсорбція	2
1.2.	Флуоресценція	12
1.3.	Флуорофори та хромофори	19
1.4.	Мічення, біокон'югація, хімічна біологія	24
1.4.1.	Клік реакції	Error! Bookmark not defined.
1.4.2.	Таги	Error! Bookmark not defined.
1.5.	CD та IR	27
1.6.	MS	29
1.7.	Хроматографія	34
1.8.	Гель-електрофорез	37

Інструментальні методи

1.1. Абсорбція

Пам'ятка:

- Абсорбція світла (оптична густина) пропорційна відстані, яку проходить світло крізь розчин (L) та молярній концентрації розчину (C): $OD = \epsilon \cdot C \cdot L$. Коефіцієнт пропорційності (коефіцієнт поглинання, коефіцієнт екстинкції) – ϵ – абсорбція розчину довжиною оптичного шляху 1 см і концентрацією 1 моль/л
 $OD = \epsilon \cdot C \cdot L$
- Абсорбція світла рівна десятковому логарифму відношення інтенсивності світла, що потрапило на розчин до інтенсивності світла, що вийшло з розчину
 $A = \text{Log}(I_0/I_1)$
Наприклад, розчин з $OD=2$ пропускає 1% світла.
- Більшість комерційних спектрофотометрів погано вимірюють поглинання більше 2,5, але цю проблему можна обійти використовуючи коротший оптичний шлях.
- Комерційні барвники мають $\epsilon=50\,000 \dots 150\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$
- Онлайн-довідник з спектрами поглинання багатьох флуорофорів <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/class.html>
- Триптофан має $\epsilon_{280}=5700 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$. Тирозин $\epsilon_{280}=1280 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$. Поглинанням інших амінокислот на 280 нм можна знехтувати.
- Калькулятор коефіцієнтів поглинання пептидів <https://pepcalc.com>
- ДНК та РНК поглинають на 260 нм. Інтенсивність поглинання залежить від конкретних нуклеотидів, але якщо вона невідома то можна застосувати приблизну формулу: $C(\text{мкг/мл}) \approx A_{260} \cdot 50$
- Калькулятор поглинання ДНК/РНК <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

Обов'язковий рівень

Приклад 1

Яка оптична густина 1 мкМ розчину родамін, якщо коефіцієнт поглинання на довжині хвилі вимірювання становить $\epsilon=80\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$?

Розв'язок: $A = \epsilon \cdot L \cdot C = 1 \text{ см} \times 10^{-6} \text{ М} \times 80\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1} = 0,08$

1. Яка оптична густина розчину АТФ з концентрацією 10 мкМ? ($d = 1 \text{ см}$, $\epsilon_{260} = 15400 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$)
2. У спектрофотометричному аналізі розчину білка було отримано значення абсорбції (оптичної густини) $A=0,75$ при довжині хвилі 280 нм. Молярний коефіцієнт поглинання білка при цій довжині хвилі становить $\epsilon=15900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, а розміри кювети – $10 \times 10 \text{ мм}$. Визначте концентрацію білка в розчині в мкМ.
3. Який відсоток світла пропускає кювета, якщо оптична густина становить 1,3?
4. Яка довжина хвилі відповідає зеленому світлу?
5. Чому речовини, які мають максимум поглинання на 350-370 нм нам здаються безбарвними, а ті, що поглинають на 420-450 нм – жовтими?
6. Чому амінокислота триптофан має молярний коефіцієнт екстинкції у десятки разів менший, ніж синтетичні флуоресцентні барвники?

Приклад 2

Яке буде поглинання на 280 нм 1 мМ розчину пептиду WHEREISFRANKIVSK в 1-сантиметровій кюветі?

Розв'язок: Спочатку розрахуємо коефіцієнт поглинання пептиду. На 280 нм поглинають триптофан (W, $\epsilon=5700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) та тирозин (Y, $\epsilon=1280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). В наведеній послідовності наявний тільки триптофан WHEREISFRANKIVSK. Тобто коефіцієнт поглинання пептиду становить $\epsilon=5700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. У випадку довших послідовностей де важко шукати символи амінокислот вручну доречно скористатися онлайн-калькуляторами коефіцієнтів поглинання пептидів.

Далі розраховуємо поглинання $A = \epsilon \cdot L \cdot C = 1 \text{ см} \times 0,001 \text{ М} \times 5700 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1} = 5,7$ – надто висока величина для практичного вимірювання.

7. Розчин пептиду NEWPEPTIDE має поглинання на 280 нм з $OD=0,81$ в 4 мм кюветі. Оцініть його концентрацію в мг/мл.
8. Розчин олігонуклеотиду CAACATTACA має $OD=0,33$ на 260 нм (1 см кювета). Яка його концентрація в нг/мкл та в мкМ?
9. Який коефіцієнт поглинання (екстинкції) барвника молекулярною масою 745 якщо при розчиненні $7,1 \pm 0,1 \text{ мг}$ в $1000 \pm 2 \text{ мкл}$ етанолу утворився розчин з поглинанням $0,451 \pm 0,002$ на максимумі (455 нм)?

Приклад 3

Яка концентрація барвника в базовому розчині, якщо при додаванні $10 \pm 0,2 \text{ мкл}$ такого розчину до $800 \pm 2 \text{ мкл}$ етанолу оптична густина становить $0,711 \pm 0,003$ (1-см кювета). $\epsilon=80\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$?

Розв'язок: Спочатку рахуємо значення, а потім оцінимо похибку.

Концентрація барвника в кюветі: $C=A/(\epsilon \cdot L) = 0,711 / (1 \text{ см} \times 80\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}) \approx 88,9 \text{ мкМ}$

Концентрація у базовому розчині вища пропорційно розведенню, тобто $88,9 \text{ мкМ} \cdot (800+10)/10 \approx 7200 \text{ мкМ} = 7,2 \text{ мМ}$

Відносна похибка визначення може бути оцінена як сума відносних похибок вимірювань, бо при обрахунках виконувалось множення та ділення (див. відповідний розділ)

Поглинання: $0,003/0,711 \approx 0,42\%$

Доданий об'єм: $0,2/10 \approx 2\%$

Об'єм у кюветі: $2/800 \approx 0,25\%$

Сумарно: $\pm 2,67\%$

Тобто концентрація барвника $7,2 \text{ мМ} \pm 2,67\% = (7,2 \pm 0,2) \text{ мМ}$

10. Базовий розчин барвника з концентрацією 10 мкМ має абсорбцію 0,700. До 1 мл цього розчину додали 1,5 мл води. Яка буде оптична густина утвореного розчину?

11. Для ПЛР експерименту ви замовили праймер TCTAGAACTAGTGGATC у комерційної фірми. Замовлений продукт вам надіслали в мікропробірці як тверду речовину, що скоріш за все є натрієвою чи калієвою сіллю. Щоб приготувати розчини відомої концентрації ви розчинили весь отриманий продукт в 0,5 мл буферного розчину і відібрали 2 мкл для вимірів на п'єдестальному спектрофотометрі. Після перерахунку на 1 см OD розчину становило $5,04 \pm 0,05$. Розрахуйте концентрацію праймеру в розчині.

12. Оптична густина розчину олігонуклеотиду CUCAGUCA на 260 нм становить 0,120 (1 см кювета). Оцініть його концентрацію.

13. Спектрофотометр дає похибку $\pm 0,002$ і дозволяє виміри для $OD < 2$. З якою точністю на ньому можна виміряти концентрацію 10 мкМ розчину триптофану?

14. Спектрофотометр дає похибку $\pm 0,001$ і дозволяє виміри для $OD < 2$. З якою точністю на ньому можна виміряти концентрацію 1 мг/мл розчину триптофану?

15. У вас є розчин флуоресцеїну в етанолі з концентрацією приблизно 8 мг/мл. Ви хочете дізнатися концентрацію більш точно й можете міряти спектри поглинання в 1 см кюветі. Опишіть як це зробити.

16. Щоб визначити коефіцієнт поглинання нового барвника Me3HC його наважку масою 5 мг розчинили в 1000 мкл метанолу. 5 мкл утвореного розчину додали в 1 см кювету з 1 мл метанолу й отримали розчин з оптичною густиною 0,851 на максимумі. Оцініть коефіцієнт поглинання Me3HC, якщо його молекулярна маса становить 555 г/моль.

17. 6 мг барвника MeNR розчинили в 800 мкл метанолу. 20 мкл утвореного розчину додали в мірну колбу об'ємом 25 мл, перемішали. Поглинання утвореного розчину в 1 см кюветі становило 0,556 на максимумі. Оцініть коефіцієнт поглинання MeNR, якщо його молекулярна маса становить 644 г/моль. Для чого розведений розчин готували в мірній колбі, а не напряду в кюветі?

18. $3 \pm 0,1$ мг нового барвника PIF розчинили в 800 мкл метанолу. 5 мкл утвореного розчину додали в 1 см кювету з 2500 мкл метанолу й отримали розчин з поглинанням $0,777 \pm 0,002$ на максимумі. Оцініть коефіцієнт поглинання PIF та його похибку, якщо його молекулярна маса становить 500 г/моль, а похибка вимірювання об'ємів 0,2 мкл.

19. З якою максимальною точністю можна визначити концентрацію барвника, якщо його поглинання становить 0,055, а похибка вимірювання спектрофотометром $\pm 0,001$?

20. У вас є 1 мл концентрованого розчину міченого пептиду Fluorescein-HALYTSKASTREET. Ви взяли 5 мкл цього розчину, додали в 1 см кювету з 1000 мкл буферу й отримали поглинання 0,258 на 490 нм (для флуоресцеїну $\epsilon = 87000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Яка концентрація пептиду у концентрованому розчині?

21. У вас є 10 мл концентрованого розчину барвника з $\epsilon = 96000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в спирті. Якщо цей розчин капнути на спектрофотометр п'єдестального типу з оптичним шляхом 0,5 мм то отриманий спектр буде зашкалений і не дозволить провести розрахунки. Якщо 2 мкл цього розчину додати до 98 мкл спирту й перемішати то поглинання розведеного розчину становитиме 0,202 (оптичний шлях 0,5 мм) що відповідає $OD = 4,04$ при оптичному шляху 1 см. Розрахуйте концентрацію барвника у вихідному розчині. Яка похибка цієї величини якщо об'єми вимірювалися з похибкою $\pm 0,15$ мкл?

22. Додавання надлишку DTNB (реактиву Елмана) до 20 мкМ розчину білка призводить до збільшення поглинання на 412 нм на 0,15 ($d = 1 \text{ cm}$). У денатуруючому буфері збільшення становить 0,29 одиниці. Скільки цистеїнів знаходяться на поверхні білка та в його глибині, скільки в молекулі білка дисульфідних містків? $\epsilon(\text{TNB}^-) = 14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

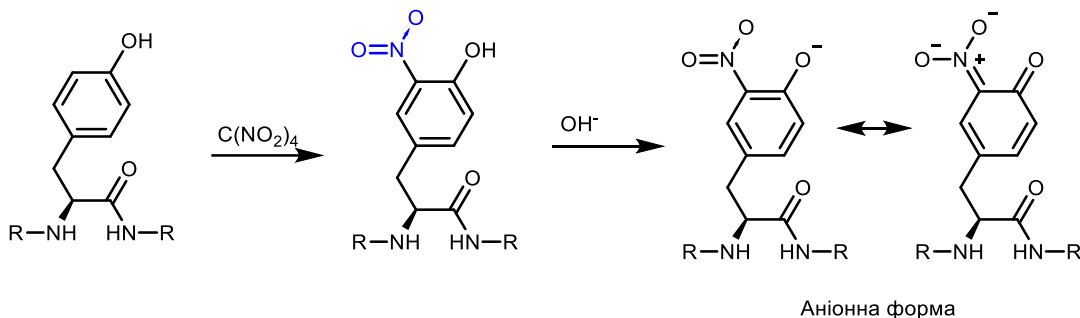
23. Вміст алкоголю в крові людини визначається ферментативно, шляхом реакції етанолу з NAD^+ у присутності ферменту алкогольдегідрогенази з утворенням NADH. Утворення NADH моніторять по поглинанні на довжині хвилі 340 нм. Нижче наведено динаміку зміни поглинання для стандартного розчину етанолу (0,100 мас%) та

Час, с	A(стандарт)	A(зразок)
0	0,006	0,005
30	0,078	0,054
60	0,149	0,105
90	0,221	0,147
120	0,302	0,198
150	0,368	0,248

для невідомого зразка. Оцініть концентрацію етанолу у зразку та її невизначеність.

24. З культури бактеріальних клітин виділили рекомбінантні плазмідні (ДНК) й ресуспендували їх отримавши 500 мл базового розчину. Якщо 20 мкл цього зразка додати у кювету з 1000 мкл дистильованої води то поглинання цього розведеного зразка при 260 і 280 нм буде 0,551 та 0,333 відповідно. Яка концентрація ДНК у базовому розчині?

25. При обробці протеїну тетранітрометаном тирозинові залишки нітруються з утворенням нітротирозину, який в лужному середовищі депротонується утворюючи жовтуватий аніон ($\epsilon_{428}=4100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



На основі даних поглинання протеїну, обробленого тетранітрометаном, при різних рН оцініть рКа нітротирозину.

pH	5,50	5,86	6,09	6,41	6,54	7,26	7,42	7,69	7,90	8,4
A428	0,13	0,134	0,138	0,158	0,168	0,234	0,252	0,268	0,284	0,312

Середній рівень

26. При визначенні концентрації протеїну методом Бредфорда 10 мкл стандартного розчину протеїну концентрацією 500 мкг/мл додали до реактиву й отримали після інкубації значення поглинання 0,123. Якщо додати 20 мкл, то значення буде 0,250. Якщо ж додати 5 мкл розчину цього ж протеїну невідомої концентрації то поглинання становитиме 0,077. Яка концентрація невідомого розчину?

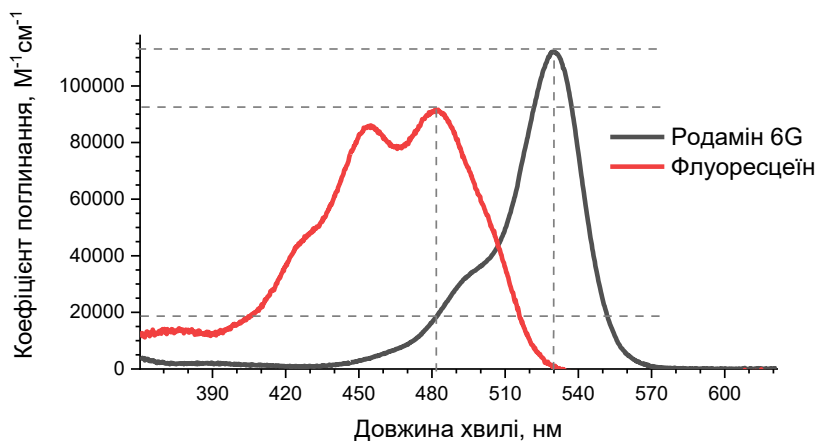
27. При визначенні концентрації протеїну методом Бредфорда використовували стандартний розчин концентрацією 400 мкг/мл доданий в об'ємах 0-20 мкл. Зразки S1 та S2 додали до реактиву в об'ємі 10 та 40 мкл щоб отримати значення в більш зручному діапазоні й покращити точність вимірів. Яка концентрація у зразках S1 та S2 на вашу думку?.

Зразок	V, мкл	A
стандарт	0	0,000
стандарт	5	0,048
стандарт	10	0,104
стандарт	20	0,221
S1	10	0,051
S1	40	0,188
S2	10	0,181
S2	40	0,601

28. Барвник IFU має максимум поглинання на 490 нм ($\epsilon=90000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) а також частково поглинає на 280 нм ($\epsilon=28000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). У вас є пептид SWARYCHIW який мітили по цистеїну maleimidною похідною IFU й очистили від надлишку барвника хроматографією. Розчин цього пептиду показує OD 0,991 на 490 нм та 0,551 на 280 нм. Оцініть ступінь мічення.

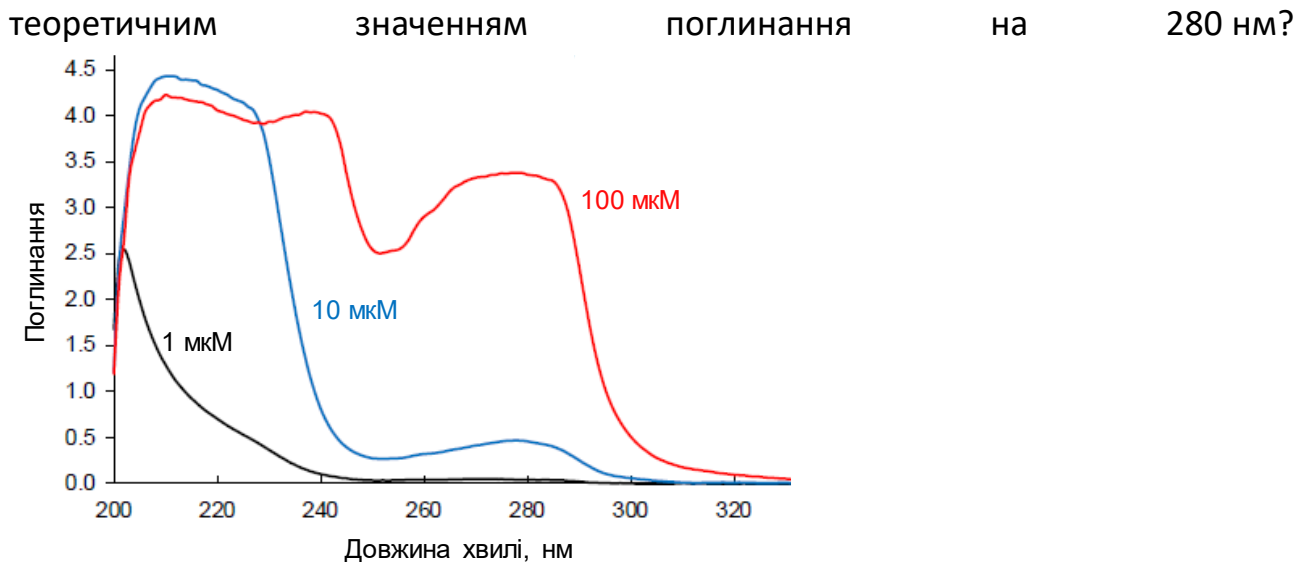
29. 5 мкл розчину барвника ($\epsilon=78000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) додали в 1 см кювету з 800 мкл буферу і отримали поглинання 0,052. Яка концентрація барвника та її похибка якщо похибка вимірювання об'ємів $\pm 0,3$ мкл, а вимірювання поглинання $\pm 0,002$? Наскільки збільшиться точність вимірів якщо додати не 5, а 20 мкл?

30. Нижче наведено спектри поглинання родаміну 6G та флуоресцеїну в етанолі (без додавання луку). Спектри нормовані на концентрацію так, що по вертикальній осі відкладено коефіцієнти поглинання. У вас є розчин суміші цих двох барвників в етанолі для якого поглинання на 480 нм рівне 0,25, а на 530 нм – 0,3 (1-см кювета). Оцініть концентрацію кожного з барвників у розчині та намалюйте приблизний спектр поглинання.



31. При роботі з лактатдегідрогеназою (ЛДГ), яка каталізує перетворення лактату на піруват з відновленням NAD^+ до NADH , для оцінки її активності в лабораторії вимірюють збільшення поглинання при 340 нм — довжині хвилі, на якій поглинає NADH . Аліна підготувала реакційний розчин, у якому концентрація NAD^+ становила 1 мМ, а лактату — 10 мМ. Вона додала 50 мкл ферментного розчину до 950 мкл реакційної суміші у 1-см кварцову кювету й спостерігала стабільне зростання поглинання при 340 нм на 0,122 одиниці на хвилину. Її однокласник Орест вирішив зекономити фермент і додав лише 10 мкл у таку ж реакційну систему та отримав зростання поглинання 0,027 одиниці на хвилину. На скільки відрізняються результати Ореста та Аліни?

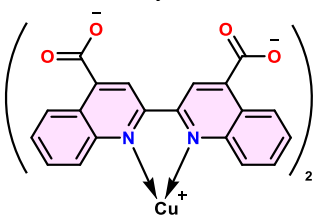
32. На рисунку нижче наведені спектри поглинання протеїну BSA виміряні в 1-см кюветі в різних концентраціях на дуже якісному спектрофотометрі. Поясніть в чому може бути причина відмінності у формі спектрів? Відомо що BSA містить 3 триптофани й 21 тирозин. Який з цих спектрів найкраще узгоджується з



Складніші завдання

33. Барвник FLT має максимум поглинання на 590 нм ($\epsilon=98000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ в етанолі). У вас є концентрований розчин барвника (біля 10 мг/мл), спектрофотометр, що міряє поглинання в діапазоні 0..2,2 з точністю $\pm 0,002$, кювети 1 см ($V=1000\text{-}2000$ мкл) та 2 мм ($V=200\text{-}400$ мкл), етанол, піпетки 1-10 мкл ($\pm 0,2$ мкл), 10-100 мкл (± 1 мкл), 100-1000 мкл (± 3 мкл), епандорфи на 1,7 мл. Вам потрібно максимально точно виміряти концентрацію розчину. Як ви це зробите і якої точності ви зможете досягнути?

34. Колориметричний метод визначення протеїну в тесті з біцинхоніною кислотою (2,2'-біхінолін-4,4'-дикарбоною кислотою) заснований на відновленні іонів міді ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{+}$) при взаємодії із залишками цистеїну, триптофану, тирозину в лужному середовищі та утворення забарвленого комплексу Cu^{+} .



Студент та аспірант використовували цей метод для визначення вмісту протеїну в невідомому зразку тканини з хвоста миші, проте отримали доволі різні результати. Студент використав для побудови калібрувального графіка очищений BSA, а аспірант – звичайний желатин для кулінарії. Згідно чиїх результатів вміст білків у зразку був вищим? Чиї результати були на вашу думку ближчі до реального вмісту й чому? Який додатковий спектрофотометричний експеримент міг би допомогти визначити концентрацію більш точно?

35. Шляхом комп'ютерного моделювання ви встановили що пептид GAVAYEGAVA має великі шанси бути ефективним інгібітором певної протеази. Щоб це перевірити ви замовили синтез пептиду у фірми щоб провести прикладні тести й виміряти IC50. Через місяць ви отримали замовлення – 14 мг білого снігоподібного порошку, що зазвичай є ознакою доволі чистого пептиду. Проте ви не знаєте чи цей пептид не містить домішок неорганічних солей та чи він у вільній формі чи є сіллю тож не хочете покладатися на масу при визначенні концентрації розчину. Ви розчинили 5 мг отриманого пептиду у 1000 мкл 100 мМ фосфатного буферу й визначили його концентрацію двома методами: (1) по поглинанню тирозину на 280 нм., та (2) по Бредфорду, використовуючи BSA як стандарт і отримали такі результати:

(1) поглинання тирозину: до 1-см кювети з 1000 мкл буферу додали 20 мкл приготованого розчину й отримали поглинання 0,135. При додаванні ще 20 мкл поглинання зросло майже лінійно, до 0,271. На основі цих даних оцініть чистоту отриманого пептиду й приблизну його концентрацію (в мкМ) в розчині, який ви приготували. Чим могли б бути викликані розбіжності даних отриманих двома методами й якому з них ви довіряєте більше?

(2) метод Бредфорда

Стандарт (10 мг/мл BSA)	0	2	4	8	16	Зразок	10	20
A595	0,001	0,020	0,041	0,082	0,160		0,020	0,041

36. Спектрофотометр вимірює поглинання з точністю $\pm 0,002$, а точність додавання розчину піпеткою $\pm 0,3$ мкл. Студент додав 3 мкл концентрованого розчину протеїну ($\epsilon_{280} = 25900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) в кювету (1 мл, 1 см) й отримав поглинання 0,033, а аспірант - додав 10 мкл цього ж розчину і отримав поглинання 0,115. Які значення концентрації і з якою точністю виміряв концентрацію кожен з них?

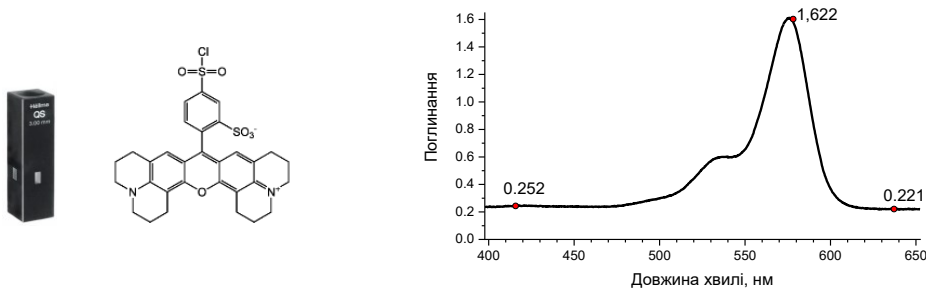
37. Студент вирішив виміряти спектри поглинання протеїну, міченого родаміном, в ось такій кюветі з внутрішніми розмірами 4×10 мм використовуючи 800 мкл розчину та оптичний шлях 1 см. Проте, він отримав дуже несподівані для себе результати залежності поглинання на максимумі від концентрації. Поясніть що пішло не так. Чи можна хоча б приблизно оцінити концентрацію міченого протеїну, в розчині, який додавали в кювету?



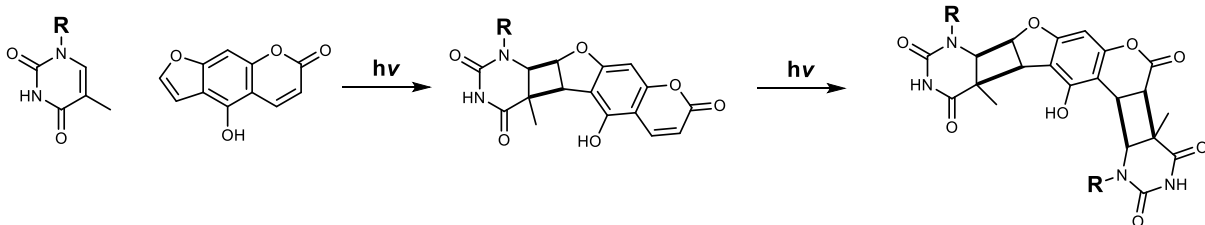
Доданий об'єм, мкл	1	2	5	10	20	50
A ₅₂₅	0,054	0,106	0,238	0,386	0,498	0,523

38. Студент хотів виміряти концентрацію дорогого розчину протеїну міченого похідною сульфорадаміну 101. Він не мав доступу до п'єдестального спектрофотометра тому вирішив скористатися мікрокюветою на 50 мкл

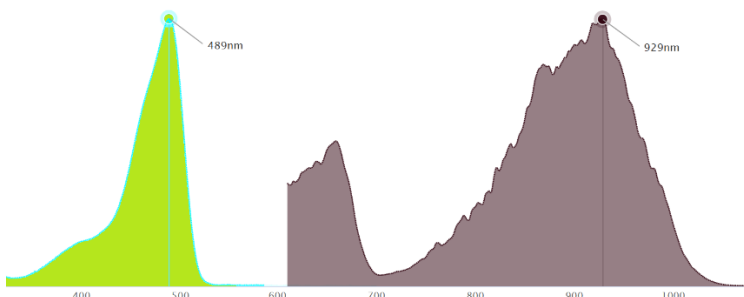
(оптичний шлях 3×3 мм). Спочатку він налив розчин в кювету виміряв спектр. Оскільки іншої такої кювети в нього не було, то базову лінію записав по повітрю. Спектр виявився зміщеним уверх. В чому була помилка? Чи можна по таких даних порахувати концентрацію і якщо можна, то яка вона буде?



39. Дотик до листя борщівника, а особливо попадання його соку на шкіру може викликати опік. Перший час людина не має жодних неприємних відчуттів. Але вже під час нетривалого і несильного опромінення сонцем ділянки шкіри, забрудненої соком, проявляються опіки, які в ясний сонячний день можуть досягати другого ступеня (пухирі наповнені рідиною). Така дія пов'язана з вмістом фуранокумаринів – речовин, що здатні зшивати дві тимінові основи при дії світла, як показано нижче на прикладі бергаптолу. Виділіть в кожній з наведених нижче молекул π -спряжену систему та, базуючись на структурі, оцініть приблизну довжину хвилі поглинання. Поясніть чому борщівник безпечніше скошувати під час дощу.

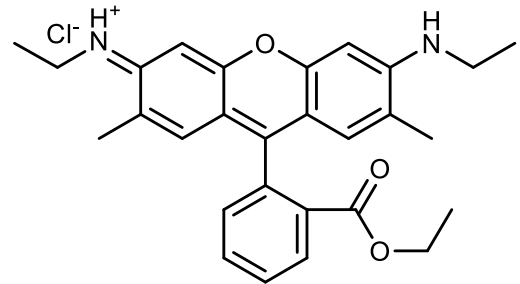
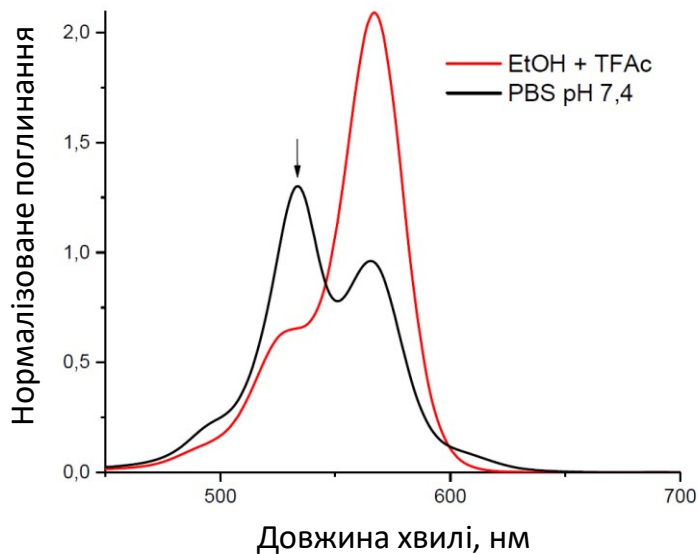


40. Нижче наведено спектри поглинання протеїну EGFP при класичному та двофотонному збудженні згідно даних бази frbase.org. Поясніть що може бути причиною того, що довжини хвиль максимумів поглинання відрізняються дещо менше, ніж вдвічі?



41. Через агрегацію спектри концентрованого розчину родаміну 6G в фосфатному буфері мають нетипову форму, яка сильно відрізняється від спектрів розведеного розчину барвника чи концентрованого розчину в підкисленому

етанолі. Намалюйте схематично як змінюватиметься спектр поглинання цього барвника при розведнні. Які взаємодії електростатичні чи ліпофільні більш відповідальні за агрегацію в цьому випадку?



Родамін 6G

42. Якщо ліпід мічений барвником АТТО-488 (з максимумом поглинання на 488 нм) розчинити в суміші хлороформ-метанол 3:1 то розчин, які і очікувалось буде мати жовтувате забарвлення дуже схоже на розчин флуоресцеїну. Проте, якщо такий мічений ліпід розчинити в чистому хлороформі то забарвлення розчину буде червоніше й нагадуватиме дуже розведений розчин родаміну. Що може бути причиною збільшення довжини хвилі поглинання якщо відомо що спектри вільного барвника в обох розчинниках практично ідентичні?

1.2. Флуоресценція

Принципи флуоресценції. Діаграма Яблонського. Квантовий вихід флуоресценції. Флуорофори. Триптофан та інші природні флуорофори. Сольватохромізм. Анізотропія флуоресценції. FRET. Час життя збудженого стану. Флуоресцентні білки. FCS.

Пам'ятка:

- Квантовий вихід флуоресценції: відношення кількості фотонів, що випромінила молекула, до кількості поглинутих.
- Квантовий вихід флуоресценції та час життя збудженого стану не залежать від довжини хвилі збудження
- При збудженні молекула флуорофору може іноді може руйнуватися переходячи в не флуоресцентну молекулу. Це явище називають фотодеградація. Для комерційних флуорофорів воно трапляється приблизно раз на 100 000 (флуоресцеїн) – 1 000 000 (родамін) поглинутих фотонів. Для природних флуорофорів типу триптофану – набагато частіше. Фотодеградація за сталої інтенсивності світла зазвичай описується кінетикою першого порядку.
- Якщо дві молекули флуорофорів знаходяться достатньо близько одна від одної, а спектр емісії однієї з них (так званого "донора") перекривається з спектром поглинання іншої ("акцептора"), то при збудженні донора енергія переноситиметься на молекулу акцептора і спостерігатиметься його флуоресценція. Цей процес відбувається коли відстань між молекулами 2-10 нм. Його ймовірність сильно зменшується з відстанню (r) : $E = \left(1 - \frac{F_{DA}}{F_D}\right) = \frac{(r/R_0)^6}{1 + (r/R_0)^6}$, де R_0 (відстань 50% ефективності) називають Фьостерівським радіусом.
- Анізотропія флуоресценції $r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$

Обов'язковий рівень

43. Флуорофор поглинув 1 000 000 фотонів з довжиною хвилі 460 нм і випромінив за рахунок цього 567 000 фотонів з довжинами хвиль від 485 до 575 нм. Розрахуйте квантовий вихід флуоресценції цього флуорофору за даних умов.
44. Якій довжині хвилі відповідає хвильове число 19500 см^{-1} ?
45. Який зсув позиції максимуму емісії відповідає більшій зміні різниці енергії (в см^{-1}) $460 \rightarrow 480 \text{ нм}$ чи $320 \rightarrow 330 \text{ нм}$?

46. Студент працює на конфокальному мікроскопі використовуючи 488 нм лазер. Він зробив знімок клітини, що містила актин-mCherry й отримав середній рівень сигналу 888. Коли він зробив такий самий знімок вдруге не змінюючи налаштувань середня інтенсивність склала 777. Чому вона зменшилась? Скільки ще знімків він зможе зробити поки середня інтенсивність не впаде нижче 300?

Приклад 1

Білок F містить два домени. Один з них було промічено Atto-488 а інший – Atto-565. Ефективність переносу енергії між цими барвниками у міченому білку становить 0,55. Оцініть відстань між точками мічення. Фьостерівський радіус для цієї пари барвників становить 6,4 нм.

Розв'язок: Скористаємось формулою залежності ефективності FRET від відстані: $E = \frac{(r/R_0)^6}{1+(r/R_0)^6}$ й розрахуємо r/R_0 .

$$0,55 = \frac{\left(\frac{r}{R_0}\right)^6}{1+\left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \Rightarrow 0,55 \left(1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6\right) = \left(\frac{r}{R_0}\right)^6 \Rightarrow \left(\frac{r}{R_0}\right)^6 = \frac{0,55}{1-0,55} \approx 1,22$$

$$\frac{r}{R_0} = (1,22)^{\frac{1}{6}} \approx 1,03$$

Потім перемножимо його на вказане значення Фьостерівського радіуса для даної пари барвників щоб отримати остаточну відповідь.

$$r = 1,03R_0 \approx 6,6\text{ нм}$$

Варто зазначити що це ідеалізований варіант, в реальності ж потрібно врахувати неточності пов'язані з довжиною лінкерів до міток.

47. Рівняння Ліпперта-Мантаги (Lippert-Mataga) яке дозволяє оцінити позицію максимуму емісії флуорофору в залежності від полярності розчинника має такий вигляд:

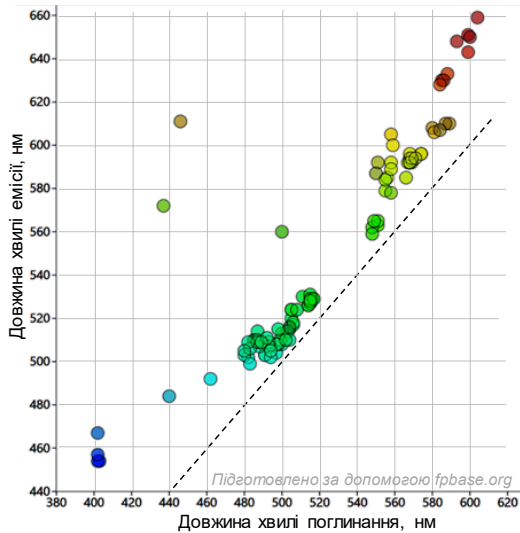
$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2}{hc} (\mu_e - \mu_g)^2 a^{-3} \Delta f + \text{const}, \quad \text{де} \quad \Delta f = f(\varepsilon) - f(n^2) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

Поясніть що означають позначення.

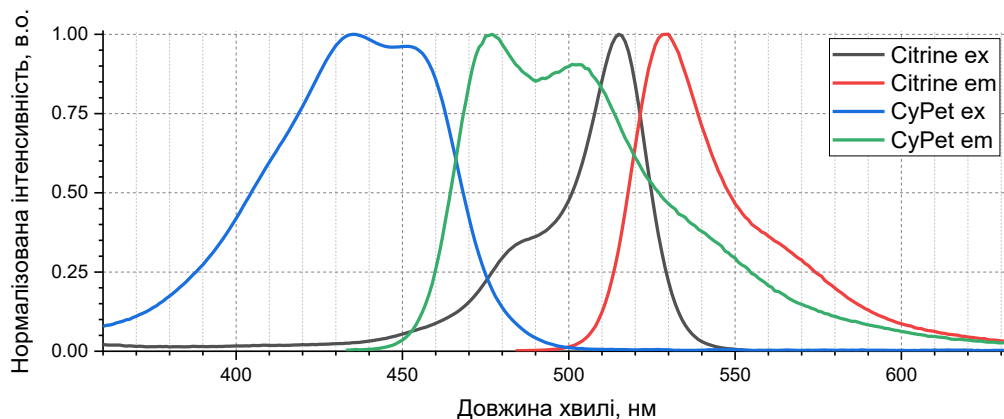
48. Протеїн TEST містить один залишок триптофану. Як зміниться анізотропія флуоресценції цього триптофану якщо а) до розчину додати гасник флуоресценції б) до розчину додати ДНК, яке взаємодіє з протеїном?

49. На графіку нижче наведено довжини хвиль поглинання та емісії флуоресцентних протеїнів, що зручні для мікроскопії (зокрема мають квантовим виходом флуоресценції більше 17% та є мономерами). Оцініть типові значення Стоксового зсуву флуоресцентних протеїнів у нм та см^{-1} . Як залежать ці величини

Від двожини хвилі поглинання? Що показує чорна штрихова лінія?



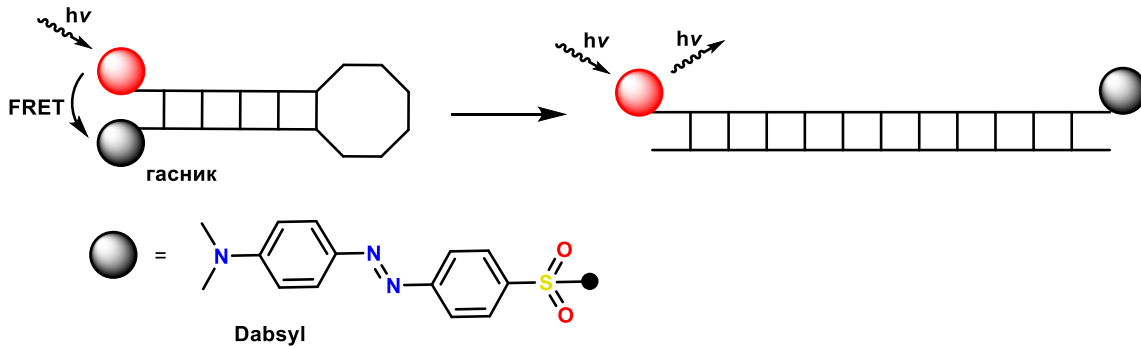
50. Нижче наведено нормалізовані спектри поглинання та емісії двох флуоресцентних протеїнів, CyPet та Citrine. Проаналізуйте їх та запишіть для кожного з протеїнів: максимум поглинання, максимум емісії, стоксів зсув, ширину лінії на половині максимальної інтенсивності (FWHM). Якщо брати до уваги тільки ці характеристики, то який з цих двох флуоресцентних протеїнів був би більш зручний для багатоканальної мікроскопії клітин?



Середній рівень

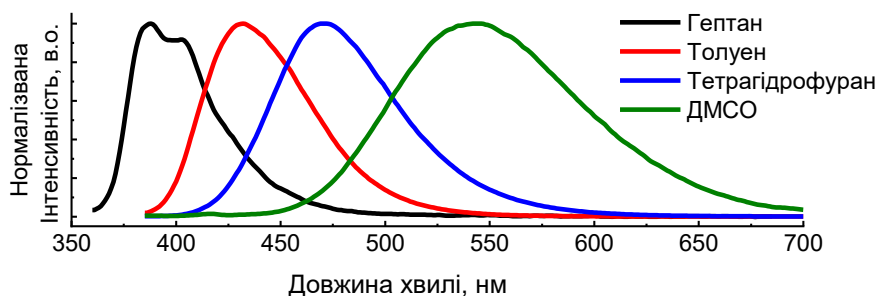
- 51.** Білок мічений Cy3 та Cy5 зустрічається в двох конформаціях з відстанню між барвниками 2 нм (20%) та 5 нм (80%). Фьостерівська відстань для пари Cy3-Cy5 становить $R_0 = 5.2$ нм. Обчисліть а) середню відстань між барвниками, б) ефективність FRET для кожного конформера, в) середню ефективність FRET по популяції. Яка середня відстань була б визначена з експерименту FRET, якщо знехтувати неоднорідністю популяції? Які експерименти могли б вказати дослідникам на наявність двох популяцій?
- 52.** Час життя збудженого стану карбоксифлуоресцеїну прикріпленого до 3' кінця РНК-ДНК дуплексу становить $\tau_D = 5$ нс. Коли на 5' кінці того ж дуплексу додатково присутній барвник Atto-565 то, час життя збудженого стану карбоксифлуоресцеїну зменшується до $\tau_{DA} = 3$ нс. Яка ефективність передачі енергії, та відстань між донором і акцептором? Вважайте що дуплекс перебуває в одній конформації (видовжена пряма), а $R_0 = 5,5$ нм. На основі цих даних оцініть довжину дуплексу в парах основ враховуючи що барвники прикріплені гнучкими лінкерами довжиною 0,4 нм кожен.
- 53.** Квантовий вихід флуоресценції сольватохромного барвника Me3HC у етанолі становить 0,52, а час життя збудженого стану – 2,33 нс. Оцініть який максимальний час життя збудженого стану може мати цей барвник в клітинній мембрані. Вважайте що барвник має одну популяцію й просту фотофізику (один час життя збудженого стану) у кожному з середовищ.
- 54.** Декануклеотид TGTGTGTGTG-Fluorescein у буфері має анізотропію флуоресценції 0,071. При повному зв'язуванні з протеїном NCp7 ця величина зростає до 0,163. Якому відсотку зв'язаного протеїну буде відповідати значення 0,123? Оцініть похибку оцінки відсотка зв'язаного протеїну якщо пристрій, на якому вимірювалась анізотропія флуоресценції дає похибку $\pm 0,002$.
- 55.** Як вплине невеличке світлорозсіювання розчином на анізотропію флуоресценції?
- 56.** Анізотропія флуоресценції 10 мкМ пептиду KLVVLLVK міченого по N-кінцю флуоресцеїном в буфері становить 0,07. Яка буде анізотропія флуоресценції 7 мкМ розчину цього ж пептиду в таких умовах?
- 57.** "Молекулярний маяк" (molecular beacon) – олігонуклеотид в конформації шпильки на одному з якого розміщено флуорофор (скажімо тетраметилродамін), а на іншому – гасник флуоресценції (скажімо дабсил). У вільному стані така практично молекула не флуоресцює через внутрішньомолекулярне гасіння. При зв'язуванні ж з комплементарною послідовністю ДНК чи РНК вона видовжується й може спостерігатися флуоресценція. Фьостерівський радіус для пари Дабсил-тетраметилродамін

становить приблизно 2,8 нм, а для пари Дабсил-Alexa Fluor 350 – близько 5,0 нм. Одна пара нуклеотидів відповідає довжині спіралі 0,34 нм. Оцініть мінімальну довжину шпильки молекулярного барвника (в нуклеотидах) при використанні кожної з цих пар барвників яка забезпечить принаймні 80% максимальної яскравості флуорофору при розгортанні.



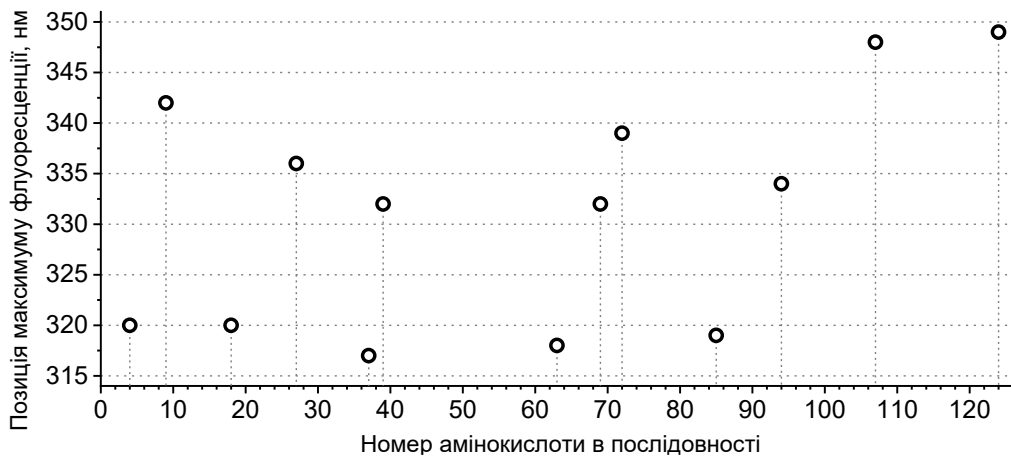
Складніші завдання

- 58.** При зв'язуванні з субстратом ензим змінює конформацію так що відстань між Trp77 та Lys125 зростає від 1,2 нм до 1,9 нм. Яку зміну сигналу можна буде спостерігати якщо промітити Lys125 карбоксифлуоресцеїном і моніторити взаємодію по ефективності FRET при збудженні 280 нм? Які можуть виникнути проблеми при вивченні активності ензиму таким способом?
- 59.** Сольватохромний флуорофор типу Донор- π -система-Акцептор має максимум емісії 420 нм в гексані й 520 нм в ДМСО. Де приблизно буде максимум емісії такого флуорофору в етилацетаті, толуені та ацетонітрилі ?
- 60.** Нижче наведено спектри емісії сольватохромного барвника в кількох розчинниках. Побудуйте приблизну залежність частоти емісії (см^{-1}) від полярності середовища (Et30) та на основі цих даних оцініть приблизну полярність мембран утворених з POPC, якщо максимум емісію цього барвника в них близько 450 нм.



- 61.** Запропонуйте експеримент по визначенню коефіцієнту дифузії родаміну. Оцініть точність яку ви зможете досягти при вимірах цим методом. Чи зможете ви таким способом розрізнити розчин міченого родаміном білка (15 кДа) і вільного родаміну?
- 62.** Поясніть чому спектр емісії сольватохромних барвників в гептані більш структурований, ніж в толуені чи ДМСО. Поясніть чому півширина спектру емісії більшості сольватохромних барвників зростає з полярністю розчинника.
- 63.** Дослідники вивчали взаємодію невеликого 140-амінокислотного протеїну з мембраною. Для цього вони синтезували мутанти протеїну, що містили триптофан в різних позиціях з записали спектри флуоресценції таких протеїнів у вільному стані та після зв'язування з мембраною. У вільному протеїні триптофан у всіх позиціях мав максимум емісії близько 350 нм. Проте, після зв'язування з мембраною спостерігалась серйозна відмінність між позиціями обумовлена різною глибиною занурення у мембрану як показано нижче. Що ви можете сказати про орієнтацію протеїну на мембрані на основі таких даних якщо відомо

що протеїн перебуває в переважно α -спіральній конформації?

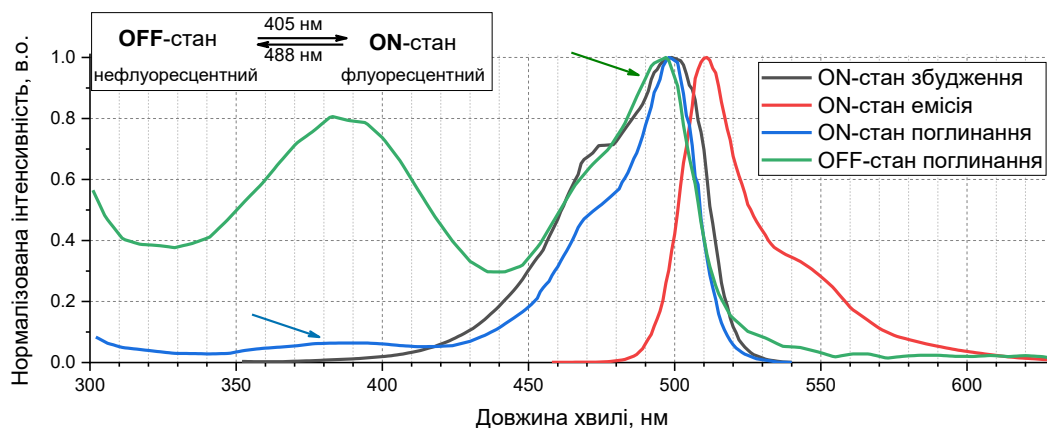


64. 440 мкл 10 нМ розчину олігонуклеотиду X міченого флуоресцеїном титрували 1 мМ розчином протеїну Y спостерігаючи за анізотропією

Додано сумарно, мкл	0	5	10	14	20	30	40	50	60
Анізотропія	0,076	0,088	0,103	0,117	0,124	0,137	0,142	0,14	0,144

флуоресценції. Оцініть стехіометрію та константу зв'язування.

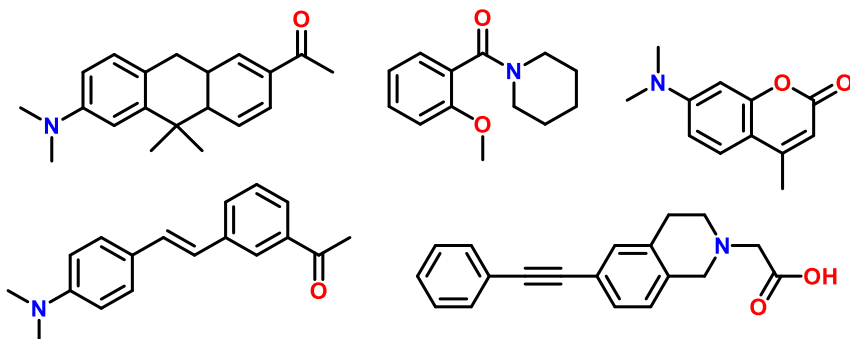
65. Одні дослідники розробили флуоресцентний протеїн Skylan-NS (скорочення від "sky lantern for nonlinear structured illumination"), який здатен переходити між нефлуоресцентним станом (OFF-стан) та флуоресцентним (ON-стан) при опроміненні світлом на 405 нм та назад при опроміненні на 488 нм. Такий барвник протеїн можна використовувати для флуоресцентної мікроскопії з надроздільною здатністю. Дослідники опублікували спектри спектри збудження та емісії ON-стану (флуоресценція) та спектри поглинання обох станів. Проте, є сумніви що спектри поглинання справді є спектрами саме чистих ON- та OFF-форм через наявність піків позначених синьою та зеленою стрілками. Зробіть припущення про походження цих піків та спектри поглинання чого могли навести дослідники.



1.3. Флуорофори та хромофори

Обов'язковий рівень

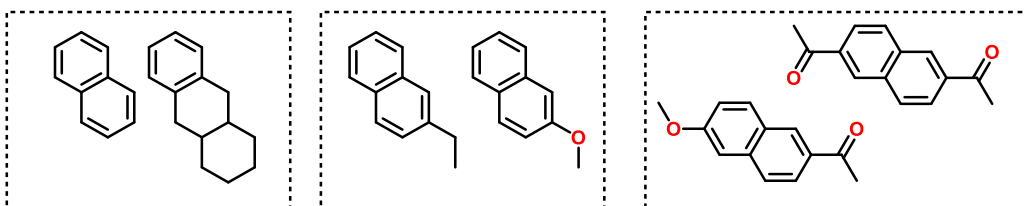
66. В кожній з наведених сполук виділіть спряжену π -систему та розмістіть їх в порядку зростання довжини хвилі максимуму поглинання світла.



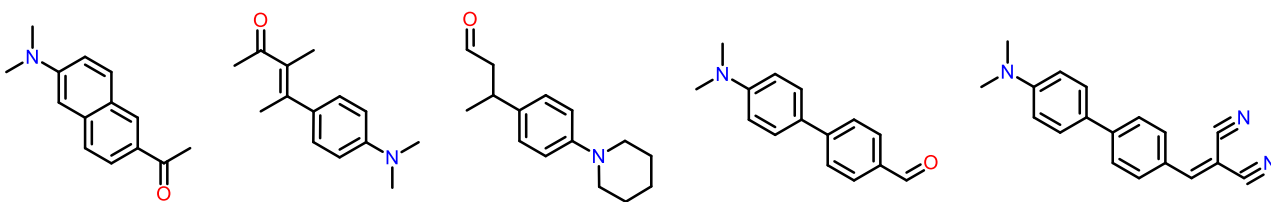
67. Наведіть формулу будь-якого сольватохромного флуорофору що поглинає в регіоні 280 нм.

68. Наведіть формулу сольватохромного барвника що поглинає в регіоні 400 нм.

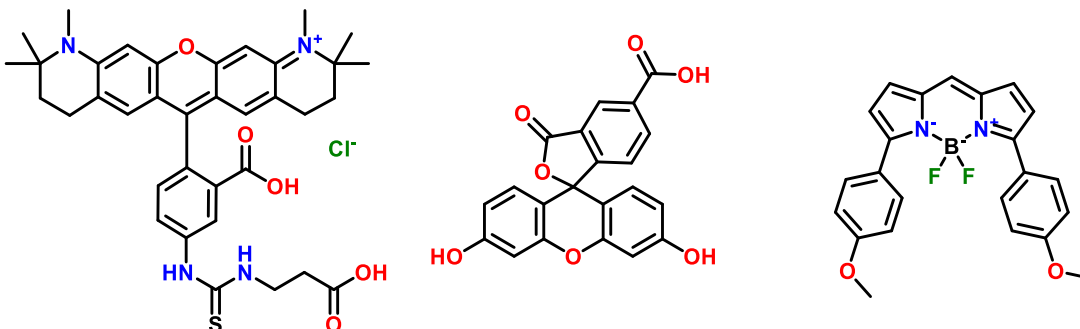
69. В кожній з пар сполук оберіть ту, яка поглинати́ме світло з більшою довжиною хвилі, й поясніть в 2-4 слова причину вашого рішення.



70. Розмістіть наведені флуорофори в порядку зростання сольватохромності (різниці дипольного моменту у збудженому й основному стані).

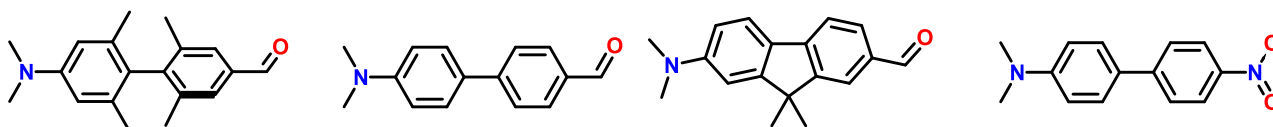


71. До якого з сімейств флуоресцентних барвників належить кожна з цих сполук

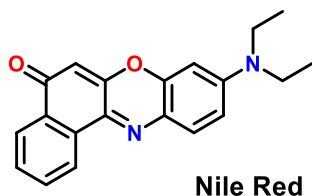


Середній рівень

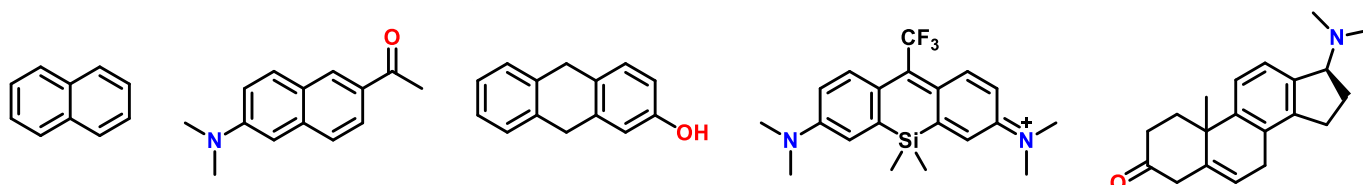
72. Всі ці чотири сполуки майже не флуоресціюють у воді. Проте деякі з них можуть мати гарну флуоресценцію при вбудовуванні в мембрани. Поясніть причини низького квантового виходу флуоресценції у воді кожної з сполук (їх може бути кілька) та те, які з сполук і чому флуоресціюватимуть у мембранах.



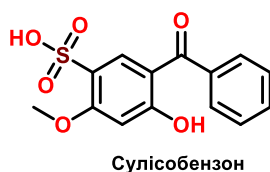
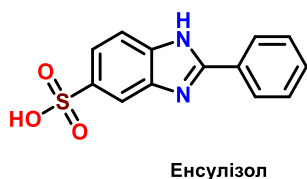
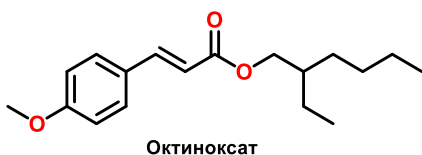
73. Тут зображено структуру сольватохромного барвника Нільський червоний (Nile Red), який поглинає близько 550 нм. Що в його структурі є спільним з родаміном та флуоресцеїном і чому на відміну від цих барвників він є сольватохромним?



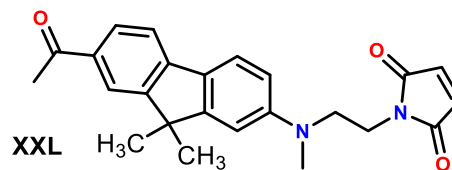
74. Розмістіть наступні молекули в порядку зростання довжини хвилі поглинання світла на максимумі.



75. Нижче наведено речовини, які часто входять до складу сонцезахисних кремів. На основі їх структури оцініть позицію максимумів поглинання та напишіть які з них захищатимуть і від UVA (315-400 нм), і від UVB (280-315 нм), а які – лише від UVB чи UVA.

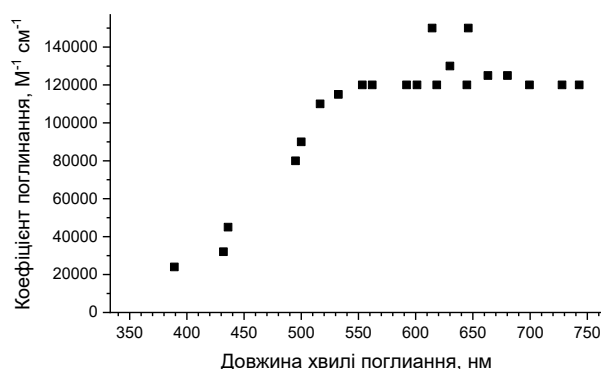


76. Тут зображено формулу сольватохромної мітки XXL, яка є подовженим варіантом продану і може використовуватися для мічення цистеїнів протеїнів. Покажіть на формулі спряжену π -систему. Запропонуйте пояснення для чого в



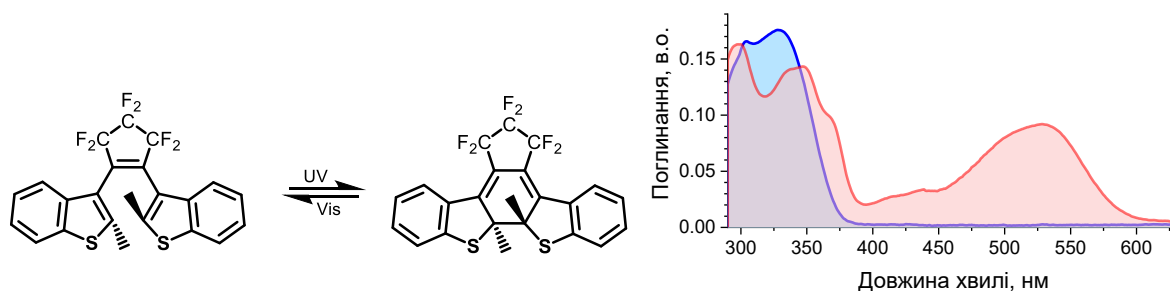
структуру було введено виділені метильні групи.

77. Нижче наведено залежність молярного коефіцієнту поглинання комерційних барвників для флуоресцентної мікроскопії сімейства Atto від довжини хвилі максимуму поглинання. Чим може бути обумовлена така залежність?

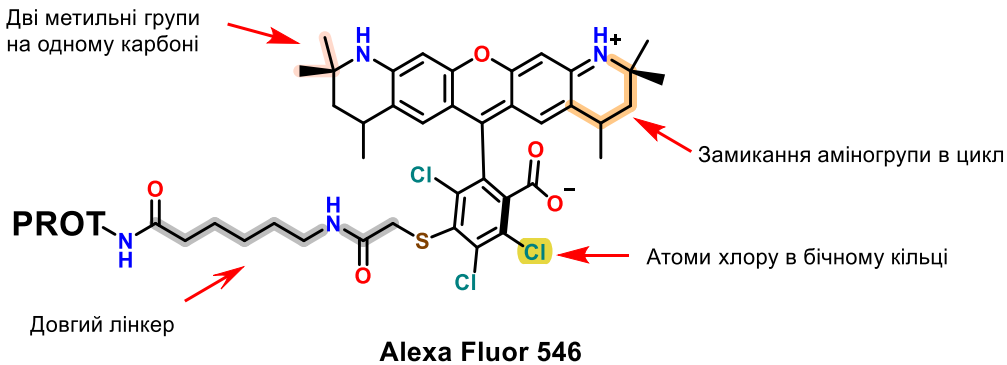


Складніші завдання

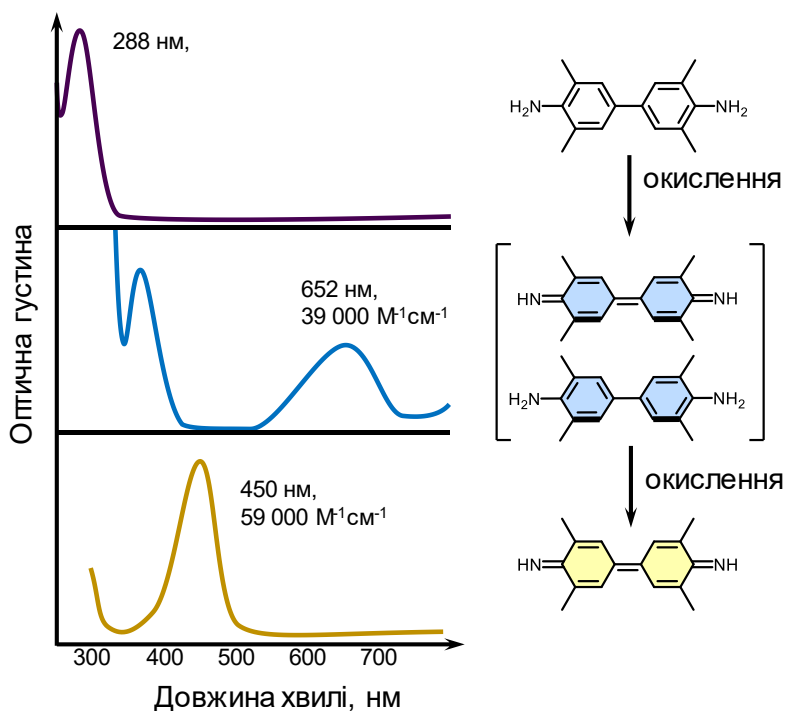
78. Деякі барвники здатні при опроміненні світлом змінювати свою структуру та переходити в форми з іншими спектральними властивостями. Таку властивість називають фотохромізмом або фотоперемиканням. Нижче наведено реакцію, яка відбувається при опроміненні одного з фотохромних барвників класу диарилетенів та спектри поглинання двох його форм. Який зі спектрів відповідає якій з форм? На яких довжинах хвиль потрібно опромінити кожен з сполук для досягнення фотоперемикання?



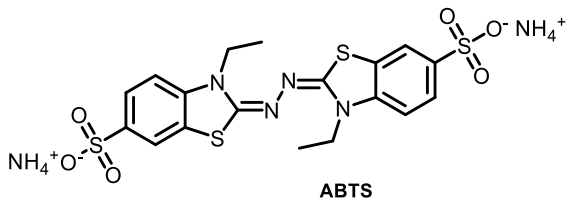
79. Нижче наведено структуру комерційного флуоресцентного барвника Alexa Fluor 546 який продається по ціні приблизно 500 Євро за міліграм. Він є аналогом в тисячі разів дешевшого флуорофора родаміну проте має кілька важливих модифікацій які ускладнюють синтез але покращують його фотофізичні властивості. Яка на вашу думку роль кожної з виділених модифікацій?



80. Тетраметилбензидин (ТМВ) часто застосовується в імуноферментному аналізі (ІФА, ELISA). В присутності пероксидази хрому (HRP) він окиснюється пероксидом водню в синій продукт, що є зручним для кількісного визначення активності пероксидази та, відповідно, вмісту мічених нею антитіл. При нормальному перебігу аналізу утворюється синій продукт, проте сильне окиснення призводить до пожовтіння розчину. Нижче наведено схематичні спектри та формули сполук задіяних в процесі. Поясніть чому продукт одноелектронного окислення має більш довгохвильове поглинання ніж фінальний бісдіімід.



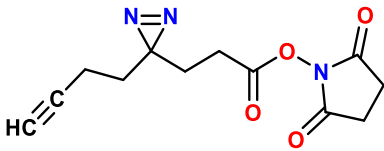
81. Для вимірювання загальної антиоксидантної здатності речовини часто застосовують барвник ABTS. Спочатку вихідний барвник окислюють зручним окисником (скажімо персульфатом амонію) до катіон-радикалу, який інтенсивно поглинає світло на 734 нм. При додаванні антиоксидантів цей катіон-радикал відновлюється в безбарвну сполуку, що і є основою для їх кількісного визначення. Намалюйте структуру катіон-радикалу ABTS, виділіть його спряжену систему та поясніть чому він, на відміну від безбарвної відновленої форми має довгохвильове поглинання.



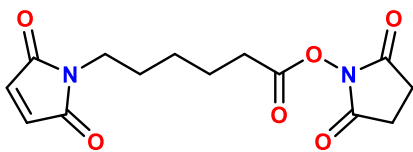
82. Флуоресцентний білок GFP містить природний флуорофор всередині β -діжки з 11 β -смужок. Білок можна розділити на дві частини — GFP₁₋₁₀ (основний фрагмент) та GFP₁₁ (малий пептид, ≈ 16 амінокислот). Ці фрагменти окремо не флуоресціюють, але коли вони зближуються в просторі, то самозбираються в замкнену β -діжку, яка захищає флуорофор від води, що гасить флуоресценцію. Це явище можна використовувати для вивчення взаємодій протеїнів в клітинах. В одній лабораторії потрібно вивчити чи утворюють комплекс два цитозольні білки А та В у клітині. Вчені сконструювали дві експресійні плазміди: Плазмід 1: А–GFP₁₋₁₀, Плазмід 2: В–GFP₁₁. Після трансфекції клітин HeLa цими плазмідами провели флуоресцентну мікроскопію та побачили яскраву зелено-флуоресценцію в цитоплазмі. Який контрольний експеримент потрібно провести, щоб переконатися, що флуоресценція зумовлена саме взаємодією А та В, а не випадковою дифузією фрагментів GFP?

1.4. Мічення, біокон'югація, хімічна біологія**Обов'язковий рівень**

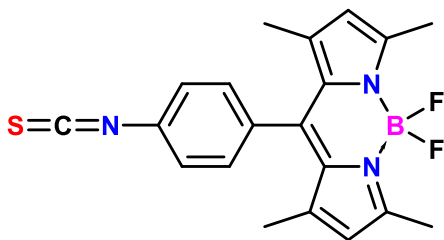
83. Ця сполука містить три функціональні групи й застосовується при вивченні взаємодій протеїнів. Поясніть як. Яка з груп використовується для початкового ковалентного мічення по аміногрупах?



84. Як така сполука буде реагувати з цистеїнами протеїнів? В яких умовах і з чим реагуватиме інша група?



85. Одна з українських компаній нещодавно розпочала випускати такий барвник з сімейства BODIPY. Який на вашу думку найпростіший спосіб приєднати його до протеїну?

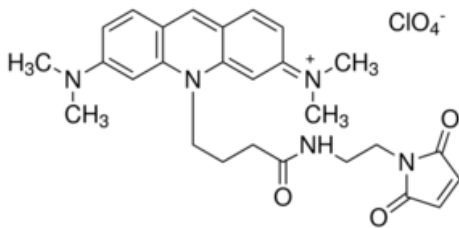


86. Ви маєте 50 мкл 2 мМ розчину AlexaFluor546-малеїміду. Скільки його потрібно додати для мічення 200 мкл 234 мкМ розчину моноцистеїнового мутанта протеїну X щоб отримати двократний надлишок мітки?

Середній рівень

87. Пептид STEPHANYKCHEMISTRY обробили спочатку надлишком малеїмідної похідної родамину, потім – надлишком флуоресцеїн-ізотіоціанату. Намалюйте схематично продукт який ви б очікували.

88. Це структура Atto 495. Де в ній малеїмід і для чого він там?



Приклад 1

До 100 мкл 100 мкМ протеїну X що містить 1 цистеїн додали 10 мкл 2,3 мМ Atto488-малеїмід, інкубували 2 години. Потім барвник відділили пропусканням через буферообмінну колонку (size exclusion) при чому розчин протеїну розвівся до 180 мкл. Яка концентрація міченого протеїну очікується в утвореному розчині?

Визначаєм яка речовина в надлишку:

Протеїн $100 \text{ мкл} \cdot 100 \text{ мкМ} = 10^{-8} \text{ моль}$

Барвник $10 \text{ мкл} \cdot 2300 \text{ мкМ} = 2.3 \times 10^{-8} \text{ моль}$

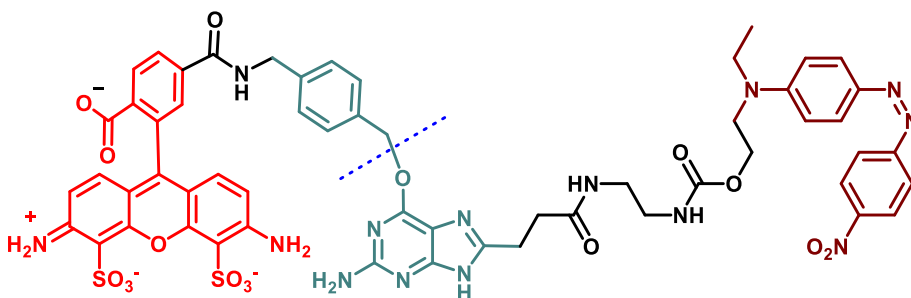
Барвник в надлишку, отже протеїн промітиться весь.

Концентрація впаде тільки через розведення

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = 100 \times 100 / 180 \approx 55,6 \text{ мкМ}$$

89. Нижче наведено структуру флуорогенної мітки для мічення по SNAP тагу. Вона флуоресціює після зв'язування з протеїном, але не світиться у вільній формі – що сильно зменшує фонову флуоресценцію при міченні протеїнів у клітинах. Які функції фрагментів показаних кожним кольором? Що показує синя штрихова лінія?

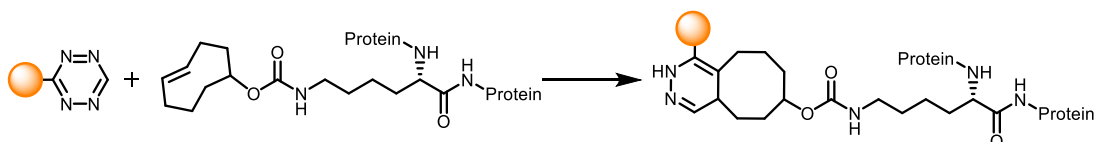


Складніші завдання

90. Для вивчення зміни конформації 300-амінокислотного протеїну Homc1 шляхом FRET експерименту зручно викорисатати протеїн з двома різними мітками, Atto560 (донор) та Atto647N (акцептор) на N- та C-кінцевих доменах. При цьому не важливо на якому з кінців яка мітка. Домішка протеїну що містить тільки акцептор не буде заважати експерименті, бо майже не збуджується при опроміненні донора, а от фракція протеїну, в якій є тільки донор заважатиме досить сильно. Щоб приготувати такий протеїн аспірантка спочатку отримала мутант Homc1-A30C-S273C що містить два вільних цистеїни, а потім промітила акцептором і донором. На першому етапі вона додала до 500 мкл 200 мкМ розчину протеїну 20 мкл 6 мМ розчину Atto647N-малеїмід у ДМСО та проінкубувала півтори години. Після того як протеїн пропустили через маленьку буферообмінну колонку щоб очистити від низькомолекулярних речовин отримали 570 мкл розчину з сумарною концентрацією мітки 201 мкМ. Наступним етапом було введення Atto560. Для цього до отриманого розчину додали 40 мкл 5 мМ розчину Atto560-малеїмід й інкубували 2 години. Після відділення надлишку барвника на буферообмінній колонці отримали 600 мкл міченого протеїну в якому концентрація Atto560 була 140 мкМ, а Atto647N – 180 мкМ. Оцініть яка концентрація у фінальному розчині бажаного продукту (протеїну з двома різними мітками), протеїну з дома акцепторами та з двома донорами. Як потрібно змінити умови експерименту щоб отримати більше відношення кількості бажаного продукту до протеїну з двома донорами? Всі етапи мічення проводили з додаванням ТСЕР, який відновлював дисульфідні зв'язки, але майже не заважав реакції малеїмідів.



91. Реакції тетразинів з трансциклооктенами (TCO–Tetrazine) є однією з найшвидших біоортогональних реакцій (k до $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Нижче наведено приклад мічення протеїну тутразиною похідною барвника по неприродній амінокислоті, яка є похідним лізину. Як практично можна було б здійснити такі перетворення в клітині?



1.5. CD та IR

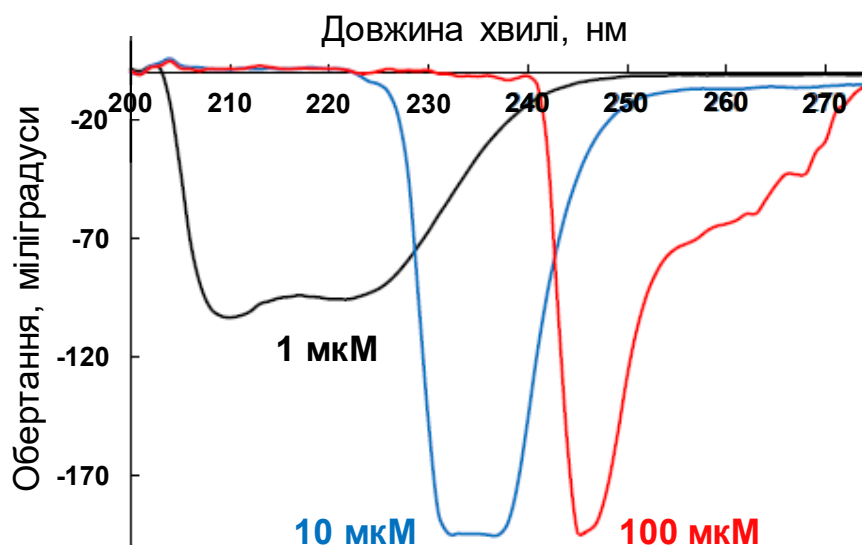
Середній рівень

- 92.** Пептид STEPHANYKFRANKIVSKSAMPLEQWERTYIPASDFGHKLCVNMSAMPLE в 70% гексафторізопропанолі набуває α -спіральної конформації на 80-90%. Який сигнал на 222 нм ви очікуєте для нього в CD спектрі. (10 мкМ розчин, 2 мм кювета).
- 93.** Вимірювання обертання площини поляризації світла довжиною хвилі 222 нм 1,1 мкМ розчином 225-амінокислотного протеїну X (25,5 кДа) дає $\theta_A = 1,25$ міліградуса (mdeg). Для 375-амінокислотного протеїну Y ця величина становить 2,36 міліградуса. Чи дозволяють ці дані встановити який з цих білків має більший вміст α -спіралі? Довжина кювети 0,1 см, похибка вимірювання концентрації протеїнів 5%, похибка вимірювання обертання (CD сигналу) – 8%. Оцініть приблизну кількість амінокислот в α -спіральній конформації в кожному з протеїнів.
- 94.** При нагріванні розчину протеїну EE відбувається його денатурація (розгортання). За даними CD-спектроскопії (сигнал на 222 нм) 50% денатурації відбувається при 56°C. Натомість сигнал флуоресценції єдиного триптофану у протеїні показує 50% перетворення (падіння сигналу при 322 нм та зростання при 345 нм) при 60°C. Чим це може бути обумовлено?
- 95.** Студент проаналізував CD спектр пептиду IVANFRANKIVSKTARASSHEVCHENKIVSK й зробив висновок про його конформацію: α -спіраль 10%, β -складчастий шар 73%, неструктуровані фрагменти й повороти 17%. Керівник навіть не вчитуючись в послідовність й не дивлячись на спектри сказав що висновки не вірні. Чому він був таким впевненим в цьому?

Складніші завдання

- 96.** Під час лабораторної роботи студенти мали визначити яка частина 607-амінокислотного протеїну BSA перебуває в α -спіральній конформації. Для цього їм було потрібно розчинити твердий протеїн у буфері, виміряти його концентрацію на спектрофотометрі, приготувати розчини зручних концентрацій, поміряти CD-спектри, розрахувати середню еліптичність на амінокислотний залишок (MRE, θ) на піку 222 нм та порівняти її з теоретичним значенням для чистого α -спірального протеїну $-40\,000$ град·см²·дмоль⁻¹. Проте, неікувано виявилось що форма спектру залежить від концентрації (див графік нижче). Очікувані піки на 208 та 222 нм були видимі тільки в 1 мкМ розчині. Чому в 10 мкМ розчині повністю зник сигнал на 208 нм і з'явився широкий пік на 230-

240 нм? Якій речовині відповідає гострий пік на 247 нм у найбільш концентрованому розчині? Всі спектри міряли в 1-см кюветі спробуйте на основі цих даних оцінити яка частина амінокислот BSA перебуває в α -спіральної конформації.



97. В кювету з 220 мкл буферу додали 10 мкл 120 мкМ розчину пептиду X. Після цього утворений розчин відтитрували 1 мМ розчином ліпосом DOPG в тому ж буфері (1 мМ) записуючи спектри CD через 120 секунд після кожного додавання. В таблиці наведено сигнал на трьох різних довжинах хвиль. Оцініть константу зв'язування та стехіометрію взаємодії.

Додано сумарно, мкл	0	2	5	9	14	20	27	35
l_{221} , mdeg	-0,09	-0,78	-1,77	-2,47	-3,19	-3,48	-3,67	-3,90
l_{223} , mdeg	-0,05	-0,74	-1,74	-2,45	-3,20	-3,50	-3,69	-3,96
l_{252} , mdeg	0,11	0,10	0,06	0,05	-0,03	-0,05	-0,05	-0,14

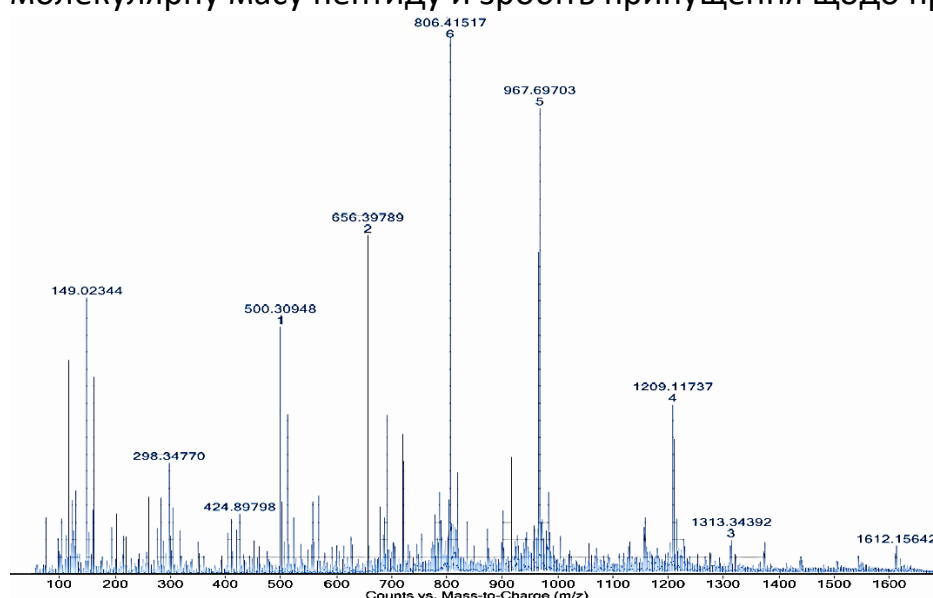
1.6. MS

Пам'ятка

- В спектрі вимірюється відношення маси до заряду іонізованих частинок (m/z). Інтенсивність піків залежить як від вмісту речовин, так і від умов іонізації тому не може вважатися кількісно. Приблизні порівняння кількості можливі тільки для сполук дуже близької структури (протеїн і його мічена форма, скажімо).
- Наявність іонів може впливати на
- В спектрах протеїнів при електроспрейній іонізації (ESI) спостерігаються піки що відповідають різним ступеням протонування протеїнів.
- В MS/MS спектрах можна спостерігати піки що відповідають почерговій дисоціації залишків окремих амінокислот від молекулярного іона – на основі цього можна встановити послідовність пептиду.

Обов'язковий рівень**Приклад 1**

Нижче наведено мас-спектр (ESI) пептиду довжиною біля 40 амінокислот отриманого твердофазним синтезом. Заряди розставлені під масами піків автоматично і можуть не відповідати реальним значенням. Розрахуйте молекулярну масу пептиду й зробіть припущення щодо природи домішок.



Розв'язок: Пептид довжиною 40 амінокислот скоріш за все буде мати молекулярну масу в діапазоні $(100..140) \times 40 = 4000..5600$ Да. Діапазон спектру – m/z приблизно від 50 до 1700. В ньому будуть спостерігатися піки, які відповідають протонуванню пептиду одразу по кількох залишках – $(M+3H)^{3+}$, $(M+4H)^{4+}$ і т. п. Їм будуть відповідати піки при $m/z = (M+3)/3$, $(M+4)/4$. Спочатку випишемо найбільш чітко виражені піки на спектрі (колонка m/z). Пік 1209,12

може належати пептиду з масою в діапазоні 4000..5600 тільки якщо він відповідає заряду +4 ($4 \times 1209 \approx 4836$). Припустимо що інші піки вони відповідають послідовним вищим зарядженим станам пептиду (колонка z). Тоді рахуємо відповідні молекулярні маси пептидів: $M = (m/z) \times z - z$ (маса зарядженої частинки мінус кількість протонів на ній).

З таблиці видно, що три основні піки відповідають одному пептиду з молекулярною масою приблизно 4833. А от пік

m/z	z	M = (m/z)×z-z	
1209,12	4	4832,48	
967,7	5	4833,5	
806,42	6	4832,52	
656,4	7	4587,8	Інша речовина

656,4 скоріш за все належить якійсь іншій речовині.

На спектрі також наявний малоінтенсивний пік 1612,16, який відповідає заряду +3 пептиду з молекулярною масою 4833 ($(4833+3)/3=1612$), що додатково підтверджує наші висновки щодо маси пептиду.

Щодо домішок, то біля кожного з основних піків спостерігається велика кількість дрібніших піків як дещо вищої, так і дещо нижчої молекулярної маси – скоріш за все вони відповідають домішкам у пептиді, що виникли під час поганого введення певних амінокислот в пептидному синтезі. Загальною кількістю піків, що не відповідають бажаному пептиду доволі висока. Хоч мас-спектроскопія й не кількісний метод, але в цій ситуації можна впевнено сказати, що вміст домішок перевищує 10%.

98. В чому різниця між ESI і MALDI?

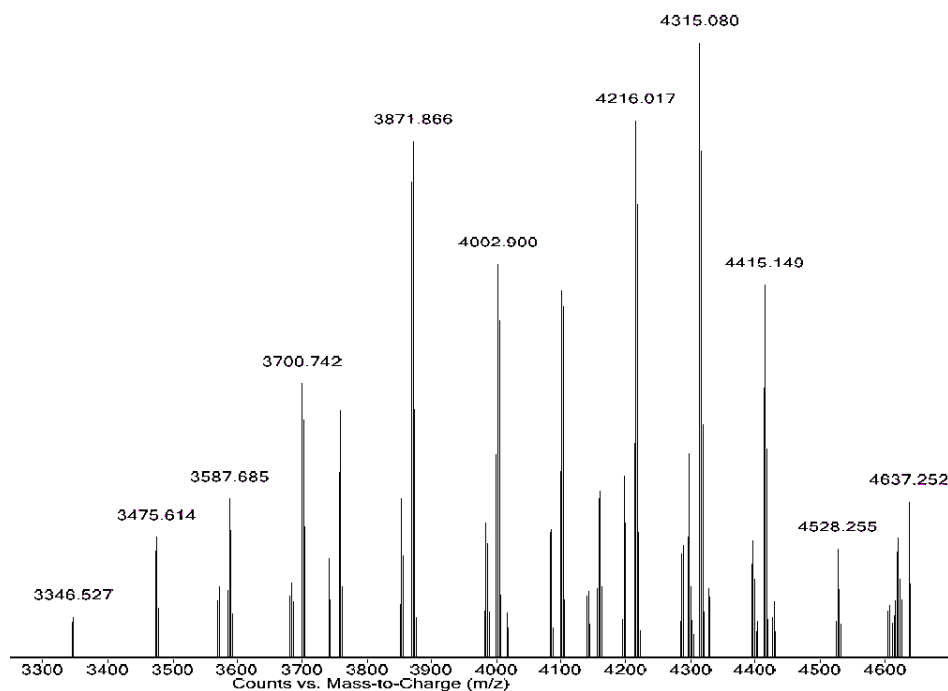
99. Які піки ви очікуєте в ESI спектрі пептиду TKACHYK ?

100. Найбільш інтенсивні піки в MS спектрі протеїну (ESI, вода/ацетонітрил з додаванням TFA) при $m/z = 2000, 1818, 1667, 1538$. Яка його молекулярна маса?

101. Розчин пептиду MARIARAK в суміші ацетонітрил-вода підкислений TFA ввели в ESI мас-спектрометр і спостерігали піки 1030 (70%), 1052 (30%). Про що це свідчить?

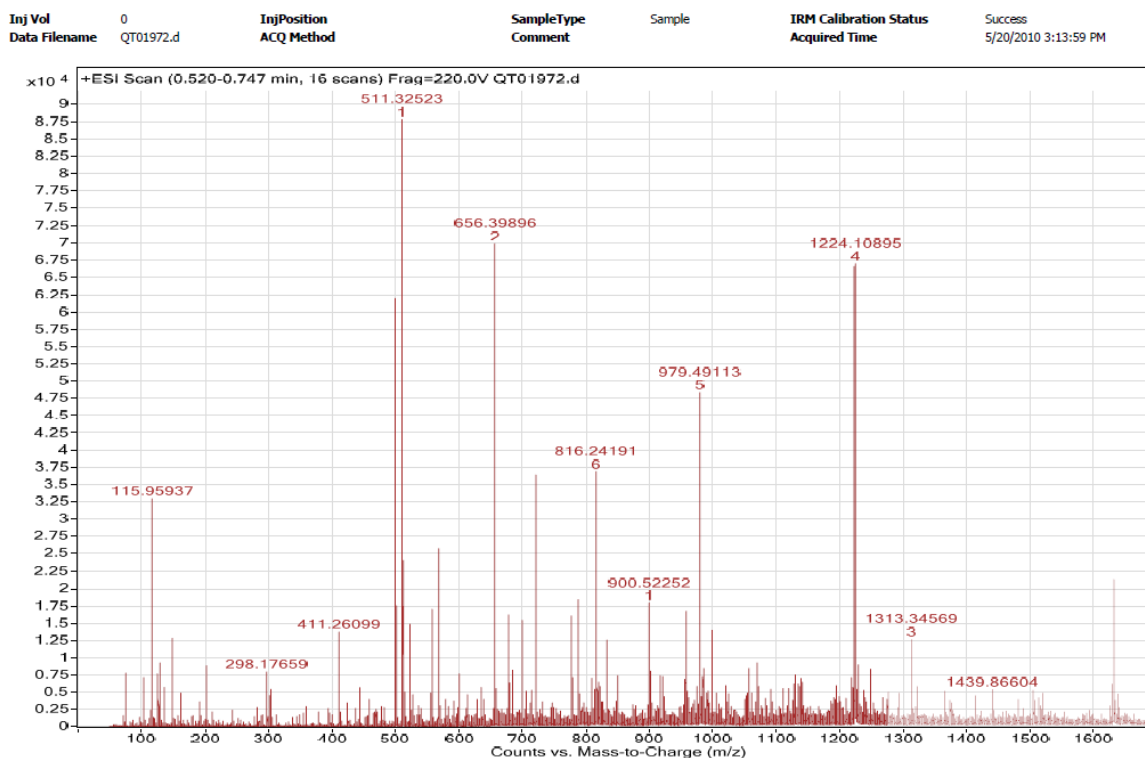
102. Нижче наведено MS-MS спектр пептиду Aβ з однією мутацією (ToF, ESI, $V_{frag}=220$ V, дані після деконволюції). Що ви можете сказати по цьому спектру про послідовність пептиду, позицію й тип мутації? Послідовність WT Aβ(1-

42): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA.



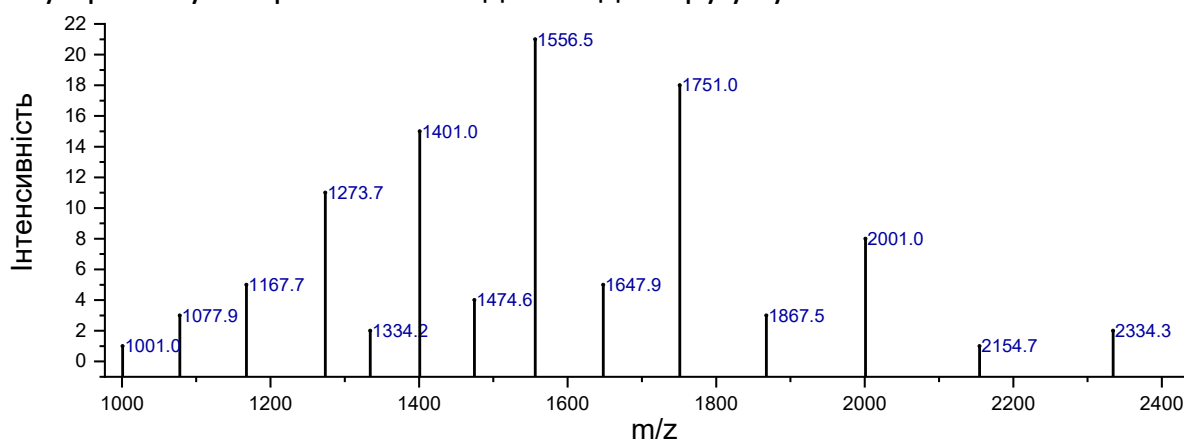
103. Які іонні сигнали (m/z) і з якими відносними інтенсивностями ви очікуєте спостерігати в депротонованій іонній формі 4-хлорбензойної кислоти (ESI(-) іонізація)?

104. Оцініть молекулярну масу пептиду на основі маспектру (очікувана маса лежить в діапазоні 4-6 кДа)

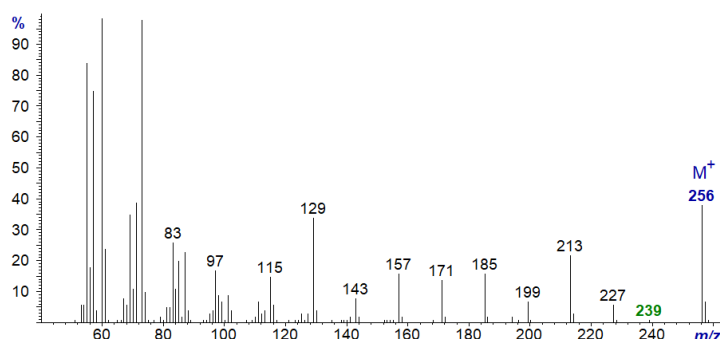


Середній рівень

105. Нижче зображено схематичний вигляд ESI(+) спектру суміші протеїну і його димеру утвореного за рахунок міжмолекулярного дисульфідного зв'язку. Більшість програм для автоматичної деконволюції не враховує інтенсивності піків і некоректно інтерпретує такі спектри. Розрахуйте вручну молекулярну масу протеїну та приблизний відсоток димеру у суміші.



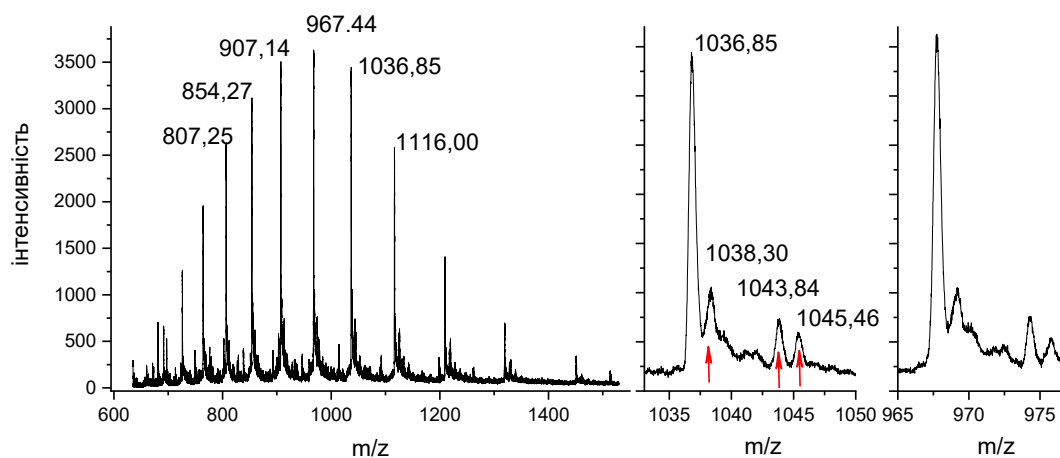
106. Нижче наведено MS-спектр жирної кислоти, яка була одним з основних продуктів при гідролізі жиру полярного ведмедя. Що це за кислота?



Складніші завдання

107. В лабораторії вивчали протеїн α -синуклеїн з молекулярною масою близько 15 кДа та готували його для *in vitro* дослідів експресією в бактеріях. Проте, з'явилися повідомлення, що для властивостей протеїну критично важливим є ацетилювання N-кінця. Тому лабораторія вирішила модифікувати свої підходи до експресії і додатково ввела в бактерії плазмід з геном ензиму, що дозволяє ацетилювати протеїни. Після експресії й виділення протеїну не було зрозуміло чи такий підхід спрацював тому вирішили перевірити наявність ацетильної групи за допомогою мас-спектроскопії. Нижче наведено мас-спектр протеїну з

молекулярною масою. (ESI (+), вода/ацетонітрил 50/50, 0,1% TFA). Загальний вигляд та окремо два регіони біля найвищих піків. Розрахуйте молекулярну масу протеїну та поясніть ймовірне походження піків позначених стрілочками.



1.7. Хроматографія

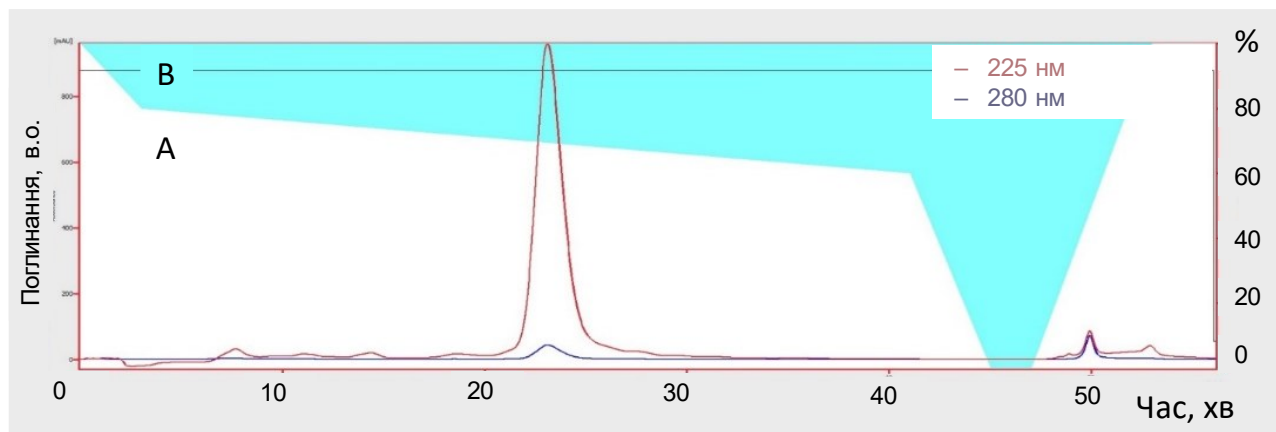
RP-HPLC, хроматографія витіснення, афінна хроматографія, іонообмінна хроматографія.

Обов'язковий рівень

108. Вам потрібно виділити пептид GLEKSLVRLGDVQPSLGKESRAKKQRQ з суміші інших пептидів та протеїнів отриманих після фракційного осадження. Для цього ви плануєте використати іонообмінну хроматографію. Катіонну чи аніонну колонку краще застосувати в цьому випадку і чому?

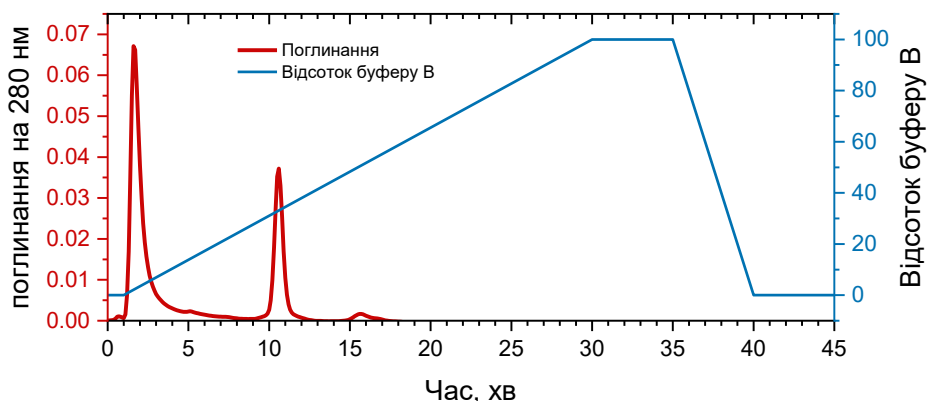
109. В якому порядку виходитимуть з RP-C8 колонки наведені пептиди (лінійний градієнт вода→ацетонітрил, 0,1% TFA): TRATATATRATATA, KPRGPRATRATATA, VWAFAFAFRAFAFA, TRAKAKAKRAKAKA.

110. Нижче зображено приклад іонообмінної хроматограми протеїну використовуючи розчин А: фосфатний буфер рН 7,4; розчин В: фосфатний буфер рН 7,4, що містить 1 М NaCl. Напишіть приблизно програму градієнту, який використовувався в експерименті (таблицю залежності вмісту розчину В в суміші від часу). Чому на вашу думку виміри поглинання проводились на цих двох довжинах хвиль? Чому пік домішки з'явився на 50 хв, після моменту найвищої концентрації солі?



111. Нижче зображено приклад іонообмінної хроматограми суміші після мічення 15-кДа протеїну, що містив 1 цистеїн, флуоресцентною міткою. В ній присутні мічений протеїн, дицистинний димер протеїну (який утворився внаслідок окислення цистеїну в дисульфід замість мічення) та непрореагована мітка. Який з піків відповідає кожному з компонентів на вашу думку? А: фосфатний буфер рН

7,4; В: фосфатний буфер pH 7,4, що містить 1 М NaCl.



112. Оцініть концентрацію міченого протеїну в зразку, хроматограму якого наведено вище, якщо відомо що було введено 20 мкл зразку. Потік 1 мл/хв, оптичний шлях в абсорбційному детекторі 1 см. Молярний коефіцієнт поглинання мітки на 280 нм становить $35\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Складніші завдання

Приклад 1

Ваші колеги-хіміки синтезували для вас модифікований пептид і очистили його від низькомолекулярних домішок, проте вам потрібно очистити його від домішок інших пептидів схожої структури (які практично завжди присутні після твердофазного пептидного синтезу). Найкращим способом для цього є оберненофазна ВЕРХ (RP-HPLC) на колонці C6 або C8. В першу чергу ви зробили аналітичне вколювання на вашій єдиній препаративній колонці в лінійному градієнті А: вода+0,1% TFA, В: ацетонітрил+0,1% TFA.C8 і отримали результат схематично зображений нижче.

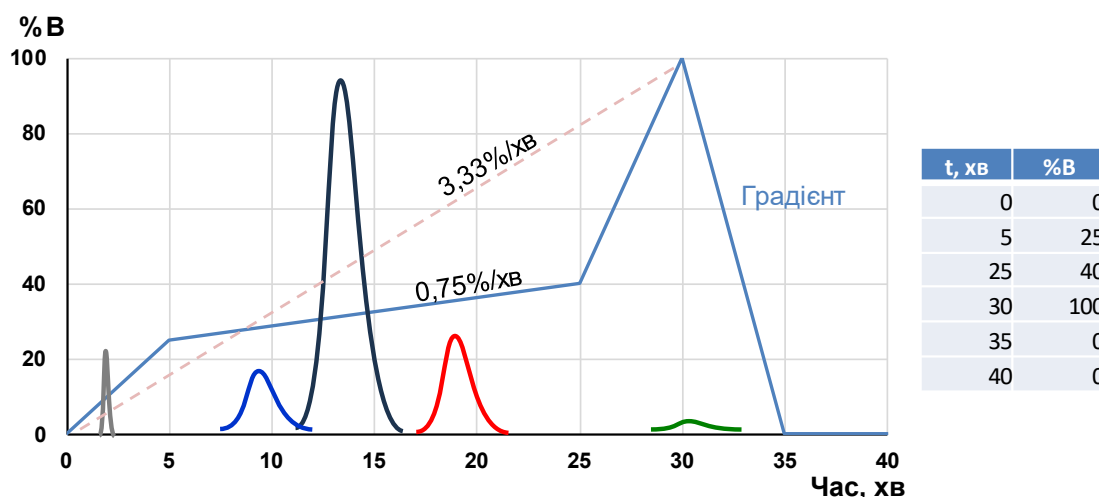
Запропонуйте градієнт, тривалістю не довше 45 хв для препаративної очистки цього пептиду на такій колонці.



Розв'язок: Для ефективної очистки потрібно досягнути набагато кращого рознесення часу виходу пептиду та домішок. Цього можна досягнути

зробивши градієнт більш пологим в діапазоні де виходить бажаний пік, та прискоривши його в інших діапазонах для економії часу.

Пік бажаного протеїну виходить приблизно на 12 хв. Пік вколювання – на 2 хв. Отже, бажаний пік виходить з складом суміші. Що входить в колонку на $12-2=10$ хв, тобто $\approx 33\%$ В. В наявному градієнті зростання %В становить приблизно $100\%/30\text{хв} = 3,3\%/хв$. Одним з можливих варіантів є сповільнити градієнт в діапазоні 25-40% пройшовши це зростання за 20 хв, з середньою швидкістю $0,75\%/хв$ – що в 4,4 рази повільніше за наявний.

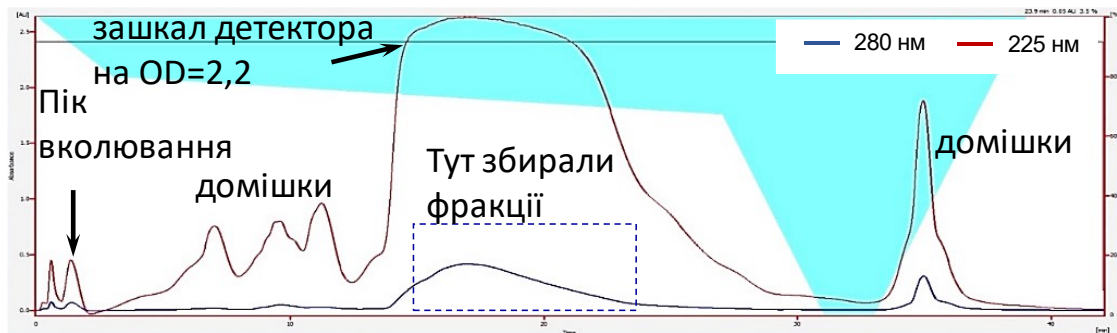


В новому градієнті бажаний пептид теж, скоріш за все виходитиме з сумішшю що містить $\approx 33\%$ В. Така суміш входить в колонку на ~ 11 хв і виходитиме, відповідно на 2 хв пізніше, ~ 13 хв. Оскільки новий градієнт приблизно в 4 рази повільніший, то й рознесення між піками буде приблизно в 4 рази більше а самі піки стануть дещо ширшими.

Насамкінець варто зазначити що ми зберегли підйом концентрації В до 100% в кінці градієнту щоб забезпечити вимивання всіх домішок з колонки, а також зберегли повернення до початкових умов в кінці градієнту щоб забезпечити підготовку (еквілібрування) колонки до введення наступного зразка в межах програми.

113. Під час практики в науково-дослідній лабораторії студентам дали завдання очистити протеїн іонообмінною хроматографією. Вони використовували градієнт $20\% \rightarrow 40\%$ В за 20 хв (А – рН 7,5 буфер без солі, В – такий самий буфер, але з 1 М NaCl), потік 2 мл/хв, 6 мл колонка. Бажаний протеїн виходив на 18 хв. Фракції по 1 мл збирали автоматизованим пристроєм. Вихідний розчин протеїну був доволі розведений, близько 100 мл 200 мкМ розчину. Щоб зекономити час студенти використовували велику петлю вколювання об'ємом 10 мл та все одно робота зайняла близько дня (10 окремих вколювань). Науковий керівник дещо скептично поставився до якості очистки протеїну студентами і щоб перевірити вколов в таких самих умовах в систему 0,5 мл першої з зібраних фракцій. На жаль виявилось що протеїн в ній містив близько 20% домішки, що виходила на 16 хв

(на 2 хв раніше піку протеїну). Студенти вирішили що забруднені фракції можна просто перечистити. Вони об'єднали по 2 перші фракції з кожного вколювання ($2 \times 10 \times 1$ мл) та вкололи 10 мл такої суміші в систему. Вони сподівалися що протеїн як і до цього вийде широким піком біля 18 хв з якого можна було б зібрати чисті фракції. Проте, весь протеїн вийшов з колонки десь на 5-7 хв – набагато раніше ніж перед цим. (1) Що стало причиною такої поведінки? (2) Що потрібно було зробити студентам перед повторним вколюванням в пристрій комбінованих фракцій?



1.8. Гель-електрофорез

Нативний, SDS-PAGE, ізоелектричне фокусування

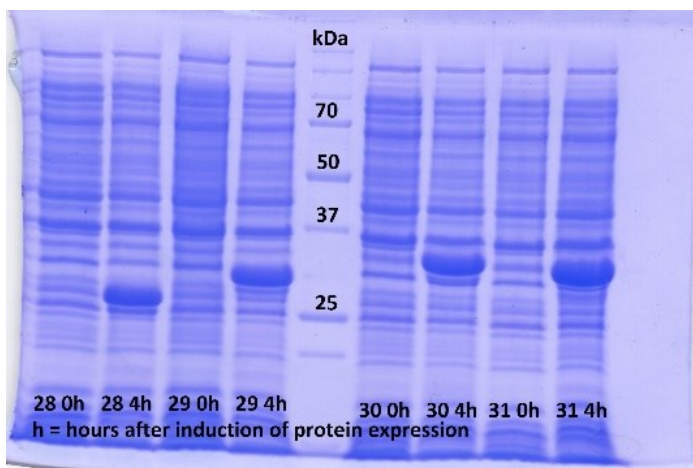
114. В середньому додецилсульфат натрію (SDS) зв'язується з денатурованими білками в співвідношенні 2 молекули SDS на одну амінокислоту. Оцініть заряд альбуміну (~67кДа) після зв'язування з SDS.

115. Трипсин не здатен проникати крізь мембрани клітин чи розщеплювати протеїни в мембранах, проте він успішно розщеплює позамембранні частини мембранних протеїнів. Як можна використовувати комбінацію SDS-PAGE та роботи з трипсином для вивчення структури рецепторів?

116. При SDS-PAGE аналізі в лунку за-звичай додають близько 20 мкг протеїну. При профарбовуванні кумасі й якісному проведенні експерименту такі смуги добре видно, а от смужки що відповідають 0,2 мкг протеїну, видно лише ледь-ледь. Для аналізу чистоти отриманого протеїну Олександр додав в лунку 10 мкл розчину з концентрацією 1 мг/мл і отримав красиву смугу на 28 кДа. Оля ж приготувала зразок з концентрацією 5 мг/мл і додала використала дві лунки: в одну додала 2 мкл цього розчину, а в іншу – 12 мкл. Очікувано друга її лунка вийшла перевантаженою й смуги розплилися. Проте, вона була впевнена що зробила експеримент більш правильно бо могла детектувати наявність домішок, що присутні в менших кількостях. Який приблизно відсоток домішок могли б побачити Олександр та Оля в своїх експериментах?

117. При аналітичному ультрацентрифугуванні 70 кДа м'язовий білок тропоміозин осідає майже в півтори рази повільніше, ніж 65 кДа білок гемоглобін. Чим це може бути викликано? Яку різницю ви б очікували для швидкості руху цих двох протеїнів на SDS-PAGE?

118. SDS-PAGE часто використовується при приготуванні протеїнів в бактеріальних культурах для оцінки ступеня експресії та чистоти. Нижче наведено приклад гелю на якому аналізували бактеріальні лізати при експресії в *E.coli* 4 різних протеїнів (позначено як 28, 29, 30, 31) зразки до індукції та 4 години після неї. Центральна лунка була використана для стандарту молекулярних мас. На основі цього гелю оцініть молекулярну масу кожного з протеїнів 28,29,30,31. Яку приблизно частку від усієї маси бактеріальних протеїнів складає бажаний білок в цих експериментах?



119. При гель-фільтрації протеїну молекулярну масу оцінили як 200 кДа, проте на денатуруючому SDS-PAGE (в присутності β -меркаптоетанолу) видно лише дві смуги на 35 та 65 кДа. Що ви можете сказати про структуру протеїну на основі таких даних?

120. Оцініть pI протеїну, якщо залежність швидкості його міграції до катоду під час електрофорезу від pH має такий вигляд (від'ємні значення вказують на міграцію до аноду):

pH	5	5,5	6	6,5	7,0
Швидкість, мкм/с	0,50	0,17	- 0,21	-0,52	-0,84