

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ ФИЗИКИ  
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

А.Н. Туранов

**БИОФИЗИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**  
**КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ**

Для студентов специальности  
12.03.04 - Биотехнические системы и технологии

Казань – 2026

УДК 530  
ББК 22.3  
Т86

Напечатано по рекомендации учебно-методической комиссии  
Института физики  
Казанского (Приволжского) федерального университета  
(*протокол №5 от 22.01.2025*)

автор:  
Профессор кафедры медицинской физики, д.т.н., А.Н. Туранов

Рецензент – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической  
физики им. академика Е.Е. Никольского  
Казанского государственного медицинского университета,  
к.ф.-м.н. **А.А. Суханов**

Т86     **Туранов А.Н.**

Биофизика и молекулярная биология. Конспект лекций. Для студентов специальности 12.03.04 - Биотехнические системы и технологии / А.Н. Туранов. – Казань: Отечество, 2026. – 22 с.

«Биофизика и молекулярная биология. Конспект лекций» – учебно-методическое пособие, предназначенное для студентов третьего года обучения Института физики Казанского федерального университета, изучающих биотехнику. В пособии кратко описаны основы ряда физических методов исследования биосистем на молекулярном уровне.

УДК 530  
ББК 22.3

Казань, 2026

## Содержание

Введение.....	4
1. Биомолекулы и биомоторы.....	5
2. Твизеры.....	7
3. Реометры.....	11
4. Ультрацентрифуги.....	14
5. Динамическое рассеяние света.....	16
6. Двойное лучепреломление.....	19
7. Дифференциальная сканирующая калориметрия .....	21
Литература.....	22

## Введение

Биофизика включает в себя биоакустику, биоэлектричество, биоэнергетику, биомеханику, биооптику и медицинскую физику, по классификации ЮНЕСКО. Биофизика, как и молекулярная биология, использует самые современные методы исследования биосистем на молекулярном уровне.

Курс «Биофизика и молекулярная биология» читается на 3 году обучения студентам, обучающимся по специальности биотехнические системы и технологии в Институте физики КФУ. Предполагается наличие у студента базы в виде курса «Общая физика», а также знаний биологии и химии в рамках школьной программы. При выборе методов осознанно избегалась спектроскопия во всех видах (оптическая, магнитно-резонансная, диэлектрическая и т.п.), т.к. этим методам уделяется достаточно много внимания в других курсах.

Необходимость данного пособия обусловлена большим количеством ошибок не только стилистических или грамматических, но и фактических в русском переводе прекрасного двухтомника [1], который был взят за основу. Эти досадные неточности приводят к вопросам у студентов и затрудняют усвоение материала. Постарался избежать подобного в представленном очень кратком конспекте лекций. Без излишних подробностей, используя минимум формул, изложены основы ряда методов, в которых в последние десятилетия достигнут значительный прогресс. В случаях, когда это уместно, указаны недостатки данных методов на основе опыта, полученного при их реальном использовании.

Надеюсь, что представленное пособие окажется полезным широкому кругу студентов и специалистов смежных областей. Искренне благодарю всех, кто прочел рукопись и внес полезные исправления! Отдельная признательность Н.Ф. Галиуллиной за помощь и терпение при подготовке пособия! Все замечания и предложения прошу высылать на электронную почту: [anturanov@kpfu.ru](mailto:anturanov@kpfu.ru).

*Автор*

## 1. Биомолекулы и биомоторы

Прежде чем обсуждать методы исследования, необходимо уделить минимальное внимание описанию объектов исследования. Биомолекула – это соединение, которое синтезируется живым организмом: ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), РНК (рибонуклеиновая кислота), белок или полисахарид. К биомолекулам также относят липиды, витамины, гормоны и пр. Биологический мотор – обычно это белок, осуществляющий линейное или вращательное движение в ходе внутриклеточного транспорта и других биологических процессов.

ДНК – биополимер, состоящий из нуклеотидов, каждый из которых в свою очередь содержит азотистое основание (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибозу (углевод) и остаток фосфорной кислоты. ДНК состоит из спирально закрученных цепей, соединенных водородными связями. Открыто и описано большое количество форм ДНК: А, В, С, D, E, G, H, I, J, P, S, Z, митохондриальная и т.д.

В-форма – обычная форма ДНК, наиболее распространенная в живых клетках. Это правозакрученная двойная спираль (более точный термин – «винт», но общепринято использовать именно «спираль»). Водородные связи образуются между азотистыми основаниями, 10,5 пар оснований на виток. Цепи антипараллельны друг другу. В спирали есть бороздки, большая и малая.

А-форма образуется в условиях дегидратации, она более компактна. Диаметр спирали чуть больше, а вот шаг спирали – чуть меньше. У А-формы 11 пар оснований на виток.

Z-форма в отличие от канонических А и В левозакрученная, имеет 12 пар оснований на виток. Большая бороздка отсутствует.

H-форма – тройная спираль, образуется при связывании большой бороздки ДНК В-формы с олигонуклеотидом (длиной  $20 \pm 5$  нуклеотидов) посредством водородных (хугстиновских) связей.

Митохондриальная форма – кольцевая двойная спираль.

РНК – состоит из нуклеотидов, фосфатной группы и рибозы. Отличия от ДНК: цепь – одна и значительно короче; одно из четырех азотистых оснований – урацил вместо тимина; дополнительный атом кислорода в углеводе. Виды РНК: мРНК – матричная; тРНК – транспортная; рРНК – рибосомная; микроРНК – некодирующая, а также другие. Бывают кольцевая и даже двухцепочечная РНК.

РНК обладает первичной, вторичной и третичной структурой. Типичные вторичные структурные единицы РНК: шпилька (А-форма двойной спирали); шпилька с дополнительным спиральным выступом; шпилька с А-выступом. Третичная структура ДНК сложна и очень разнообразна.

Полисахарид – полимер, состоящий из моносахаридов, каждый из которых содержит –ОН и –СНО группы. Т.е. это полимерные цепи из глюкозы, фруктозы и т.п.

Белок – высокомолекулярное соединение, состоит из комбинации 20 стандартных аминокислот. Белок обладает четырьмя видами структурной организации: от первичной до четвертичной. Первичная структура – последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Огромное количество комбинаций элементов определяет разнообразие самих белков. Вторичная структура, т.е. частичный порядок цепи, стабилизируется водородными связями:  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листы,  $\pi$ -спирали, неупорядоченные фрагменты... По типу строения белки разделяют на три группы: фибриллярные, глобулярные и мембранные.

Ограничимся двумя примерами биологических моторов, поскольку даже упрощенное описание их устройства и принципа действия требует пространного предварительного описания. Каждое мышечное волокно содержит тысячи миофибрилл, состоящих из последовательно соединенных саркомер (базовых сократительных единиц). Каждый саркомер ограничен с концов Z-дисками. Актиновая нить (белок) одним концом прикреплена к Z-диску, а второй конец направлен к центру саркомера, где перекрывается с хвостом (полипептидной цепью) миозина. Белок миозин и есть биомотор, который состоит из доменов: головки, шейки и хвоста. Головка циклически присоединяется к актиновой цепи и отсоединяется от нее, гидролизует АТФ, за счет выделившейся энергии изменяется конформация шейки (поворот на угол  $\sim 35^\circ$ ), что приводит к смещению (толчку) цепи актина относительно хвоста миозина в направлении к центру саркомера. Таким образом множество одновременных смещений актиновых нитей к центру саркомера вызывает сближение Z-дисков и сокращение длины всего мышечного волокна.

Второй пример – кинезин. В пределах клетки транспорт органелл (митохондрии, лизоцимы...), везикул, белков, вирусов и т.п. происходит вдоль тубулиновых микротрубочек или актина благодаря трем семействам белков: динеин (от периферии к центру), кинезин (обычно от центра к периферии), миозин (вдоль актина). Обычный кинезин – димер, каждая половина состоит из головки, шейки, шарнира и стебля. Стебли закручены в спираль друг с другом. На одном конце спирали – две головки, на другом – хвосты,

структура которых определяет (идентифицирует) перемещаемый груз. Головка содержит два центра связывания. В одном происходит гидролиз АТФ, за счет выделившейся энергии изменяется конформация второго центра, который связан с тубулином в микротрубочке, поворот в шарнире и образование новой связи уже в другой точке микротрубочки. Так происходит шаг кинезина. Затем шагает вторая головка. В среднем кинезин делает 100 шагов вдоль одной микротрубочки, после чего покидает ее.

В порядке напоминания. Гомологический ряд – набор химических соединений с одной структурой, но разным количеством структурных единиц. Ближайшие гомологи отличаются друг от друга на одну структурную единицу – гомологическую разность. Например, линейные алканы (метан  $\text{CH}_4$ , этан  $\text{C}_2\text{H}_6$ , пропан  $\text{C}_3\text{H}_8$  ... отличаются на одну  $-\text{CH}_2-$  группу. Также к гомологическим рядам относят близкие по составу и структуре полимеры, но различающиеся формой: шар, палочка, гауссов клубок, спираль.

## 2. Твизеры

Оптический твизер (пинцет, ловушка) – это устройство, которое позволяет захватывать микрообъект в фокус лазерного пучка и манипулировать этим объектом для изучения свойств одной (!) контролируемой биологической макромолекулы (или биологического мотора).

Молекула биотина (витамин В7 или Н) одним концом может прочно связываться с поверхностью разных материалов (стекло, полистирол, латекс, металл...), а другим – с авидином (белок) или его аналогами. Биотинавидиновые комплексы химически взаимодействуют с концом ДНК, РНК или белка. Таким образом удастся закрепить изучаемую биомолекулу, точнее ее конец, на поверхности пластины или бусинки.

Необходимо изначально оговорить, что на данный момент теория оптических твизеров находится в стадии активной разработки. Однако общие принципы функционирования понятны. Требования к бусинке весьма высоки: коэффициент оптического преломления значительно выше, чем у окружающего раствора, состав которого может изменяться в ходе эксперимента; форма, обычно сферическая; габариты в несколько микрон, точно определенные; в зависимости от специфики эксперимента могут предъявляться и другие ограничения.

Захват бусинки в фокус лазерного пучка занимает немало времени работы под микроскопом, но затем система стабилизируется, и исследователь

получает возможность определять положение объекта в пространстве под воздействием разных факторов, растягивать, скручивать и т.п. изучаемую молекулу, контролируя оба ее конца. В фокусе светового луча, точнее в перетяжке пучка, возникают значительные градиенты электрического поля. При выполнении двух условий: 1) достаточная интенсивность лазерного пучка, соответственно, градиента электрического поля; 2) значительная разница в коэффициентах преломления материалов бусинки и окружающего раствора; так называемая сила оптического градиента (аналог силы, втягивающей парамагнитный образец в область с большей индукцией магнитного поля) доминирует над силой, вызванной оптическим давлением. В результате сила, втягивающая бусинку в фокус, больше выталкивающей силы – основное условие устойчивого равновесия данной системы.

Для управления положением фокуса луча в нанометровой шкале можно использовать, например, 3D-подвижку на основе пьезодрайвера. Эта техника была хорошо отработана еще при создании сканирующих атомно-силовых микроскопов. В принципе, положение бусинки регистрируется интерферометром с точностью, превышающей атомарные размеры, однако в реальности броуновское движение снижает этот параметр на два порядка. Высокие градиенты электрического поля получают при использовании лазерных пучков с гауссовым профилем, как одномодовых, так и с модами высокого порядка. Вращать бусинку можно с помощью пучка с круговой поляризацией луча.

Если исследователь хочет растянуть молекулу, то он увеличивает расстояние между концами молекулы: между бусинками или между бусинкой и пластиной. Возникающая в молекуле сила упругости компенсируется увеличением силы оптического градиента, т.е. бусинка смещается от положения равновесия в перетяжке пучка. Зная величины смещения и градиента электрического поля в данной области пространства, нетрудно определить величину самой силы. Или можно воспользоваться градуировкой, выполненной ранее. Измеряемые силы невелики, данный метод позволяет работать в интервале 0,1–500 пН.

Магнитный твизер – это устройство, сконструированное по аналогии с измерителем магнитной восприимчивости по принципу Фарадея. Такой твизер позволяет манипулировать биологической макромолекулой. Разумеется, в нанометровом масштабе и под микроскопом. В данном случае бусинка делается из ферромагнитных материалов, а контроль ее положения в пространстве осуществляется за счет градиентов магнитного поля, кото-

рые создаются профильными конусными наконечниками магнита. Один конец биомолекулы крепится биотин-авидиновым комплексом к бусинке, а другой к стеклянной/кварцевой пластине. Сдвигая  $M$  – точку максимума напряженности магнитного поля относительно пластины, к которой прикреплен второй конец молекулы, исследователь имеет возможность изменять силу упругости в молекуле. В реальном эксперименте проще двигать как раз пластину, а не магнитную систему целиком. Зная величины восприимчивости материала бусинки и магнитного градиента вблизи бусинки, а также расстояние от центра бусинки до точки  $M$ , определяется величина самой силы. Магнитный твизер очень чувствителен, интервал измеряемых сил 0,005–100 пН. Для наблюдения за скручиванием/раскручиванием молекулы применяются бусинки с анизотропными магнитными свойствами или анизотропной формой, а вращают магнит.

Еще одним аналогом описанных выше устройств являются стеклянные микроиглы. Это конусы длиной примерно 1 см, диаметр которых изменяется от 1 мм в начале иглы, которым крепится к XYZ манипулятору, до 1 мкм на конце иглы. Стандартизация такого конуса – непростая технологическая задача. Поверхность иглы покрывается биотином, что позволяет химическим путем прикрепить к ней бусинку. При растяжении биомолекулы игла изгибается. По величине этого изгиба измеряется прикладываемая сила, обычно превышающая 1 пН. При меньших величинах измеряемой силы погрешность эксперимента становится неприемлемо большой.

Атомно-силовая микроскопия позволяет работать с отдельными атомами, не говоря уж о молекулах. Но изучение этого метода требует обсуждения большого количества специфических вопросов, что выходит за рамки нашего ограниченного по времени курса.

С помощью твизеров получено много важной информации о биомолекулах. При растяжении ДНК В-формы с силой более 60 пН молекула совершает переход в S-форму. За счет значительного увеличения угла наклона пар основания она удлиняется в 1,7 раза и уменьшается в диаметре на 30%. При отключении растягивающей силы ДНК возвращается к В-форме. Прикладывая вращающий момент к бусинке с усилием более 20 пН удается перевести ДНК из В-формы в Р-форму, добиться суперскрученности, т.е. состояния, при котором азотистые основания выставлены наружу. Оба этих перехода происходят при расплетании ДНК – одного из ключевых этапов репликации. Для полного разрыва ДНК необходима сила ~500 пН.

Другое измерение: прикрепив бусинки к разным цепям одной ДНК, была измерена сила, необходимая для разделения (расстегивания) комплементарных цепей одной ДНК за счет растяжения двух концов – примерно 10 пН.

Интересен следующий пример применения твизеров. Оказалось, достаточно приложить к концам ДНК растягивающую силу величиной 2–3 пН, чтобы исключить возможность конденсации ДНК.

Принудительное растяжение нуклеосом (комплексов ДНК с гистоновыми белками) показало, что количество пар оснований ДНК в одной нуклеосоме одинаково, а 20 пН достаточно для полного открепления этих белков от ДНК вследствие растяжения цепи.

Исследование траекторий разворачивание-сворачивание РНК со структурой шпильки доказало близость этих процессов с расстегиванием ДНК. Также исследуется влияние мультивалентных ионов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ...) на силовые характеристики образования разных вторичных структур РНК.

Растяжение изолированной молекулы декстрина (полисахарида) продемонстрировало скачок длины молекулы при силе  $\sim 700$  пН. Единственное разумное объяснение – изменение молекулярной конформации внутри мономеров. Такая эластичность полисахарида может оказаться принципиально важной при передаче сигнала.

Топология титина (белка) – это  $\beta$ -лист, состоящий из семи  $\beta$ -стрендов (нитей). Зависимость силы от удлинения при растяжении титина содержит набор пиков с амплитудой  $205 \pm 25$  пН с интервалом 0,4 нм, который соответствует длине одной аминокислоты.

Белок спектрин входит в состав эритроцитов, состоит из двух субъединиц, каждая из которых образуется из трех примкнувших друг к другу  $\alpha$ -спиралей. Для растяжения такой структуры достаточно силы в  $30 \pm 5$  пН. Это на порядок меньше, чем в предыдущем примере.

Эксперимент по изучению сокращения мышечного волокна достоин более подробного описания. К обоим концам одиночного актинового волокна были прикреплены бусинки, положение которых контролировалось оптическими твизерами. С актином вступала в контакт головка миозина, а хвост данной молекулы был закреплен на поверхности предметного стекла. Величина сдвига, происходящего в результате взаимодействия двух белков, определялась по положениям бусинок с точностью до 1 нм. Оказалось, что она лежит в интервале от 0 до 15 нм, а с учетом всех возможных взаимных ориентаций белков усредняется до  $\sim 6$  нм. Однако количество шагов на сдвиг также варьировалось от 1 до 5.

Движение кинезина было изучено твизером с использованием кварцевой бусинки, а тубулиновая микротрубочка фиксировалась на предметном стекле. В ряде экспериментов был задействован интерферометр для повышения пространственного разрешения. Для остановки кинезина приходилось прикладывать силу  $6 \pm 1$  пН. Бусинка смещалась на 8,3 нм при каждом шаге со средней скоростью 800 нм/с. В отдельном эксперименте с привлечением методов флуоресценции от головки кинезина было установлено, что характер движения “hand-over-hand”. Т.е. шаг каждой головки (около 17 нм) сопровождается поворотом шарнира. КПД такой системы ~60%.

В каждой клетке работает более 100 различных биомоторов, не только линейных, два представителя которых описаны выше, но и роторных, упаковочных и др.

### 3. Реометры

Вискозиметр Гепплера (шарик тонет в жидкости) и Оствальда (жидкость протекает по капилляру) подробно описаны во многих учебниках и пособиях, изучаются на лабораторных работах курса «Молекулярная физика». Остановимся на современной модификации – дифференциальный вискозиметр. Идея его устройства была взята из мостика Уитстона, т.е. уравнивания потенциалов между точками двух разных ветвей электрической схемы. Каждая ветвь содержит по сопротивлению с обеих сторон от точек вывода. При равенстве всех 4-х сопротивлений, точнее при одинаковом пропорциональном соотношении между сопротивлениями участков каждой ветви, мост приходит в равновесие – баланс.

Дифференциальный вискозиметр состоит из 4-х калиброванных по длине и диаметру капилляров (две ветви по два последовательно соединенных капилляра в каждой), через которые протекает раствор. Если состав раствора одинаков во всех капиллярах, то разница в давлении между точками вывода двух разных ветвей равна нулю. Состояние баланса. Если изменить концентрацию раствора в системе, за исключением одного капилляра, например, за счет задерживающего (накопительного) резервуара с раствором исходной концентрации, то между точками вывода двух разных ветвей возникнет разница в давлении, которую в большинстве случаев можно измерить с высокой точностью. Эта разница давлений пропорциональна разнице вязкостей. Контроль концентрации раствора реализуется

за счет измерения его показателя преломления или коэффициента оптического поглощения (закон Бугера-Ламберта-Бера).

Достоинства данного метода: высокая чувствительность, что позволяет работать с растворами низкой концентрации, а значит с малым количеством вещества; высокая скорость измерения.

Конформация, гибкость и гидратация биологических макромолекул критическим образом влияют на вязкость раствора. Поскольку от перечисленных выше параметров зависит функциональность биомолекул, то молекулярные биологи активно применяют вискозиметры. Особенно при изучении гомологических рядов молекул.

Обычно физические свойства гомологических рядов имеют тенденцию к постепенному изменению. В данном случае  $[\eta] \sim M^\alpha$  (уравнение Куна-Марка-Хаувинка), где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость раствора,  $M$  – молекулярная масса биополимера,  $\alpha$  – показатель, зависит от формы молекулы, например:  $\alpha = 0$  для жестких сфер, 1,7 для жестких палочкообразных частиц, 0,5 для гауссовых клубков в «идеальных» растворителях и 0,7-0,9 в «хороших».

Недостаток всех перечисленных методов состоит в том, что они не позволяют изучать зависимость вязкости раствора от скорости сдвига или градиента скорости. Большинство растворов биомолекул являются не-ньютоновскими жидкостями (например, форму низкомолекулярной молекулы ДНК можно считать палочкообразной, соответственно, она ориентируется при высоком градиенте скорости/напряжении сдвига; а высокомолекулярная молекула ДНК изменяет свою форму), а значит указанная выше зависимость содержит богатую информацию об исследуемых системах. Выход – применение современных реометров.

Измерительная ячейка реометра состоит из двух дисков (двух коаксиальных цилиндров, конуса и плиты и т.п.) с задаваемым оператором в зависимости от вязкости и других свойств исследуемого образца зазором, с точностью до 10 нм. Один из дисков, а в некоторых моделях и оба, вращается с заданной угловой скоростью (возможны и другие варианты режима работы, например, задается напряжение сдвига). Измеряя возникающий момент вращения, строится график зависимости вязкости образца от скорости сдвига.

Для достижения высокой точности измерений приходится применять воздушные и даже магнитные подшипники (подвеску) для всей движущейся части измерителя. Попадание даже маленького пузырька воздуха в исследуемый образец приводит к получению ошибочных результатов.

Производители реометров пытаются решить данную проблему создавая ячейки с особой формой верхней поверхности ячейки. Но самое слабое место всех подобных систем – необходимость субъективного контроля формы мениска жидкости на границе ячейки.

Величина вязкости одного раствора биомакромолекул при определенной концентрации, температуре и т.п. мало интересна. Лишь показатель степени  $\alpha$ , полученный в серии экспериментов, позволяет сделать выводы о форме молекулы. Жесткие глобулярные белки сферической формы демонстрируют  $\alpha = 0$  на графике  $\ln[\eta]$  vs.  $M$ . Для жестких белков асимметричной формы: чем выше асимметрия, тем сильнее  $\alpha$  отличается от 0. Для денатурированных белков в форме гауссова клубка  $\alpha \approx 0,7$ . В денатурированном белке последовательность аминокислот та же, что и в нативном, т.е. первичная структура сохранена, а вот вторичная, третичная, четвертичная уже нет.

Кстати, обычно считается, что третичная структура белка принципиально необходима для его функционирования. Это не всегда так. В клетках многие белки не структурированы в изолированном состоянии, т.е. обладают внутренней неупорядоченностью с вплоть до сотен аминокислот в последовательности. Однако такие белки четко выполняют свои функции при взаимодействии с партнерами. Именно результаты исследования вязкости растворов этих белков дали решающие аргументы, подтверждающие их существование.

Низкомолекулярные молекулы ДНК обладают палочкообразной формой  $\alpha \approx 1,7$ , а высокомолекулярные – формой гауссова клубка  $\alpha \approx 0,5-0,9$ . Расплетание двойной спирали ДНК значительно влияет на величину вязкости раствора. Форма пептидов (строительных блоков белков) демонстрирует разные величины  $\alpha$  в зависимости от растворителя или других факторов.

Отдельно стоит сказать о температурных зависимостях вязкости, которые позволяют изучать разворачивание РНК и другие конформационные изменения в исследуемых биосистемах.

## 4. Ультрацентрифуги

Возможно, в преддверии данной главы будет полезным обсудить простую и наглядную аналогию центрифуги. Шарик тонет в жидкости, известны плотности материалов и вязкость жидкости. По скорости движения шарика вниз можно определить его массу. Скорость будет медленной, если разность плотностей шарика и жидкости мала, возможно влияние других факторов. Для ускорения процесса можно «увеличить» ускорение свободного падения, т.е. быстро вращать всю систему. Для набора статистики бросим не один шарик, а горсть. Вот совокупное движение шариков – это и есть седиментация. Если набор шариков будет состоять из нескольких фракций с разными массами, то вследствие движения с разными скоростями получим профиль седиментации, состоящий из нескольких компонентов. В описываемой аналогии осталось «подключить» броуновское движение, т.е. выбрать шарики достаточно малых размеров. Теперь каждая фракция будет еще и «размазываться» по ходу движения – это результат влияния диффузии. Из законов динамики в примитивном приближении

легко получить коэффициент седиментации  $s$ :  $s \equiv \frac{u}{\omega^2 \cdot r} = \frac{D \cdot M \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right)}{RT}$ . Наиболее часто используемой единицей  $s$  является сведберг:  $1 \text{ Св} = 10^{-13} \text{ с}$ .  $u$  – Скорость шарика,  $\omega$  – угловая скорость вращения ротора,  $r$  – расстояние до оси вращения,  $D$  – коэффициент диффузии,  $M$  – масса одного моля шариков или молекулярная масса частиц в реальном эксперименте,  $\rho_0$  – плотность растворителя,  $\rho$  – плотность частицы,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура.

Центрифуга – это устройство, в котором исследуемый объект подвергается воздействию центробежных сил. Современная ультрацентрифуга способна создавать ускорение в  $10^6 \cdot g$  (при радиусе  $R \approx 0,1$  м и скорости вращения  $10^5$  оборотов в минуту). При таком воздействии на раствор седиментация, разделение смеси на фракции происходят значительно быстрее, чем в обычных условиях. Основные цели, достигаемые при центрифугировании – либо препаративные, т.е. выделение и очистка необходимого материала из сложной смеси; либо аналитические, т.е. определение молекулярной массы, формы, размера, гидратации, коэффициента диффузии (по методу расширяющейся границы) и других параметров исследуемых объектов. Речь не только о биомолекулах, но и о вирусах, органеллах, полимерах, и пр. Именно с помощью центрифугирования впервые были определены

массы гемоглобина, овальбумина и других белков, открыты рибосомы, доказан механизм удвоения ДНК...

Помимо ротора важными элементами ультрацентрифуги являются ячейка (кювета), в которую помещают раствор, и оптическая система наблюдения за процессом седиментации в образце. Ячейка имеет объем не более  $1 \text{ см}^3$ , форму сектора, оптические окна из кварца или синтетического сапфира на верхней и нижней гранях. Если применять ячейку с параллельными боковыми стенками, то осаждаемые биомолекулы, двигаясь по радиальным линиям, начинают взаимодействовать со стенками, провоцировать конвекцию... Ячейки обладают высокой механической прочностью и конструируются с большой точностью, т.к. даже применение противовеса не помогает скомпенсировать большие силы, возникающие в несбалансированной системе при таких ускорениях.

Оптическая система содержит обычно два независимых детектора. Один – на основе поглощения в среднем УФ диапазоне длин волн, второй – интерферометр Рэлея. Первый вариант основан на том, что ДНК и РНК поглощают свет вблизи 260 нм, а белки – 280 нм. По закону Бугера-Ламберта-Бера поглощение света пропорционально концентрации компонента, поглощающего на данной длине волны. Соответственно строится профиль седиментации, т.е. зависимость концентрации компонента от расстояния до оси вращения, записанная с определенным интервалом времени. Во втором варианте: два когерентных луча проходят каждый через свою ячейку (с исследуемым раствором и с чистым растворителем). При наложении лучей образуется интерференционная картина. На основе анализа искривления полос строится профиль седиментации.

Для разделения процессов диффузии и седиментации применяют уравнение Ламма, решить которое проще численно и при наложении тех или иных граничных условий. Первый вариант – метод Ван Хольде и Вайшета. Временная зависимость седиментации имеет степень 1, а диффузии – 0,5. Значит, при достаточно больших временах можно пренебречь вкладом диффузии в форму границы. Проблема лишь в том, что на практике профиль седиментации далеко не всегда выходит на плато, а интерполяция/аппроксимация данных не гарантирует высокой точности результата. Вторым вариантом – метод Стаффорда, на основе экспериментально полученного профиля седиментации строится его производная по времени. После нормализации на концентрацию и время получают гауссову кривую, в которой константа седиментации определяется из положения пика, а коэффициент диффузии из его ширины.

В аналитическом ультрацентрифугировании два экспериментальных метода взаимодополняют друг друга. Первый – скоростная седиментация, описан в предыдущем абзаце. Второй – равновесная седиментация. В этом варианте эксперимента скорость вращения ротора на несколько порядков ниже, да и ячейки короче, чем в первом методе, что значительно сокращает время достижения системой равновесия, а значит и длительность эксперимента. Зависимость концентрации ( $C$ ) частиц в растворе:

$$C = C(a) \cdot \exp \left\{ \frac{\omega^2 \cdot M \cdot \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right) \cdot (r^2 - a^2)}{2RT} \right\},$$

где  $a$  – расстояние от оси вращения до мениска. Из такой зависимости нетрудно получить  $M$  в случае однокомпонентности частиц. Если же есть распределение по массам, то пропадает возможность однозначной интерпретации результата.

Однако для обоих методов есть дополнительная возможность – варьирование  $\omega$ . Разработаны даже специальные протоколы таких экспериментов. Главное достоинство аналитического ультрацентрифугирования – высокая чувствительность, т.е. возможность работать при низкой, вплоть до 1 мкг/см<sup>3</sup>, концентрации. В случаях, когда удастся использовать флуоресцентный детектор, чувствительность повышается еще на 4 порядка! Кроме того, этот метод считается эталонным при определении чистоты, молекулярной массы (в интервале 10<sup>2</sup> - 10<sup>7</sup> Дальтон или атомных единиц массы), формы частиц, взаимодействия между ними в растворе.

## 5. Динамическое рассеяние света

Подвижность биомакромолекул – медленный процесс. Ширина его спектральной линии менее 10<sup>3</sup> Гц, что значительно меньше частоты световой волны – 10<sup>15</sup> Гц в видимом диапазоне. Оптическая спектроскопия даже в ИК-диапазоне тут бессильна. Применение оптических фильтров в лучшем случае (интерферометр Фабри-Перро) улучшает спектральное разрешение лишь до 10<sup>10</sup> Гц. Выход – анализ временных корреляционных функций флуктуаций какого-либо параметра, связанного с исследуемой молекулой. Точность такого метода значительно выше точности метода спектрального анализа.

Автокорреляционная функция показывает взаимосвязь между величинами одного параметра  $A$  сдвинутыми по времени  $t$  на интервал  $\tau$ :

$$\langle A(t), A(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \cdot \int_0^T A(t) \cdot A(t + \tau) dt .$$

В методе динамического рассеяния света (ДРС) луч лазера пропускают сквозь кювету с жидкостью. Вследствие броуновского движения флуктуирует  $I$  – интенсивность света, рассеянного исследуемой биомолекулой в растворе. Временная зависимость именно этого параметра регистрируется при определенном выбранном угле рассеяния. Затем вычисляется корреляционная функция  $\langle I(0), I(\tau) \rangle$ . Очевидно, что  $\langle I(0), I(0) \rangle = \langle I^2 \rangle$  – максимальное значение, т.к.  $I(0)$  и  $I(\tau)$  близки при малом  $\tau$ ;  $\langle I(0), I(\infty) \rangle = \langle I \rangle^2$  – минимальное, т.к.  $I(0)$  и  $I(\tau)$  независимы при большом  $\tau$ . В реальности нет необходимости в  $\tau \rightarrow \infty$ , достаточно  $\tau \gg \tau_{\text{кор}}$ , где  $\tau_{\text{кор}}$  – корреляционное (или релаксационное) время данного процесса. При эргодическом стационарном процессе, при условии отсутствия вклада от систематических экспериментальных ошибок,  $\langle I \rangle^2 = 0$ . Таким образом, для каждого компонента в системе можно записать:  $\langle I(0), I(\tau) \rangle = \langle I^2 \rangle \cdot \exp\left\{-\tau/\tau_{\text{кор}}\right\}$ . Частотный спектр связан с корреляционной функцией преобразованием Фурье, т.е. они содержат эквивалентную информацию.

Если размер исследуемой жесткой (неизменной формы) биомолекулы мал по сравнению с длиной волны падающего света, то в существенно разбавленном растворе  $\langle I(0), I(\tau) \rangle = \text{constanta} + a \cdot \exp\{-2D_{\text{взаим}} \cdot q^2 \cdot \tau\}$ , где  $a$  – амплитуда,  $q$  – волновой вектор рассеивания, зависящий от угла рассеивания и длины волны падающего света;  $D_{\text{взаим}}$  – коэффициент трансляционной диффузии. Такой коэффициент, полученный методом ДРС, часто называется коэффициентом взаимной диффузии.

Если система состоит из смеси частиц с разными коэффициентами трансляционной диффузии, например, частиц разного размера, то автокорреляционная функция становится суммой спадов экспонент. Вообще говоря, для вычисления распределения частиц по размерам из многоэкспоненциального спада необходимо решить интегральное уравнение Фредгольма первого рода. В случае близких коэффициентов диффузии разных компонентов строгое решение невозможно. И этот шаг – фундаментальная проблема, самое слабое место в методе ДРС, приводящий к неоднозначности результатов эксперимента.

Если же размер исследуемой биомолекулы сравним с длиной волны света, то вращательная диффузия и внутренняя релаксация гибких частиц вносят дополнительные вклады в спад автокорреляционной функции. Увеличение количества компонентов спада еще сильнее усложняет алгоритм анализа автокорреляционной функции. В таких случаях помогает изучение

зависимости автокорреляционной функции от угла рассеивания, т.е. от  $q$ , что помогло получить сведения о гибкости разных молекул ДНК.

Необходимо вернуться на пару абзацев назад и обсудить коэффициенты трансляционной диффузии частиц (включая молекулы или структурные неоднородности) в жидкости, определяемые разными методами:

- метод расширяющейся границы, в котором следят за изменением концентрации частиц из-за осмотического давления при смешивании двух жидкостей;

- метод наблюдения за одной частицей под микроскопом, включая нановидную микроскопию, а также конфокальную флуоресцентную микроскопию;

- метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии, в котором следят за изменением количества частиц в малом объеме раствора;

- метод ДРС включает измерения двух видов: как изучение взаимной диффузии в микрообъеме в условиях гауссовой статистики, так и наблюдение за флуктуацией числа частиц в малом объеме при очень низких концентрациях раствора;

- метод восстановления флуоресценции красителя после выцветания позволяет наблюдать среднее макроскопическое движение частиц;

- метод ядерного магнитного резонанса с градиентом магнитного поля определяет коэффициент диффузии спинов из скорости спада эха;

- метод рассеяния тепловых нейтронов, и другие методы...

Важно подчеркнуть, что движение частиц/молекул не зависит от метода наблюдения. Для невзаимодействующих между собой объектов исследования коэффициенты диффузии, определенные разными методами, совпадают. Однако в случае взаимодействующих частиц величины коэффициентов диффузии различаются, что говорит об особенностях самого метода. Например, коэффициент взаимной диффузии в ДРС в условиях гауссовой статистики определяется в ансамбле частиц, взаимодействие которых приводит к появлению биений между гармониками излучения от разных частиц. Результат – завышенное значение коэффициента диффузии. Увеличенное значение коэффициента диффузии можно получить и в ЯМР из-за межмолекулярной спиновой диффузии. Обычно в ЯМР используется термин «коэффициент самодиффузии».

Соотношение Стокса-Эйнштейна  $D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$ , где  $D$  – коэффициент диффузии,  $k$  – постоянная Больцмана,  $\eta$  – вязкость жидкости,  $r$  – радиус

сферической частицы, часто используется для оценки размеров диффундирующих частиц. Данное соотношение верно при выполнении ряда условий: форма частиц жесткая и именно сферическая; частицы не взаимодействуют между собой, т.е. раствор существенно разбавлен; размер частицы значительно больше размера молекул растворителя, т.е. выполняется граничное условие – окружающая среда однородна, неструктурирована. При исследовании движения частиц, размер которых сравним с размером молекул растворителя, коэффициент 4 вместо 6 дает значительно лучшие результаты. Для частиц анизотропной формы рассчитано большое количество формул, в которых каждой форме частицы (эллипсоиды, палочкоподобные и т.п.) сопоставлен соответствующий коэффициент пропорциональности.

## 6. Двойное лучепреломление

Явление двулучепреломления состоит в разделении пучка света на два (обыкновенный и необыкновенный) со взаимно перпендикулярными плоскостями поляризации. Эти пучки распространяются с разными скоростями. Данный эффект возникает вследствие взаимодействия электромагнитной волны с анизотропно ориентированными электронными оболочками атомов. Т.е. необходима оптически анизотропная среда. Например, монокристалл, наиболее известен исландский шпат, или раствор с частично ориентированными молекулами. Создать оптическую анизотропию в изотропном растворе можно электрическим или магнитным полем либо потоком. При изучении свойств биомолекул наиболее полезным оказалось электрическое двойное лучепреломление (ДЛП).

Количественно ДЛП выражается в разности показателей преломления  $\Delta n$  исследуемой системы относительно ориентирующего воздействия:  $\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$ .

Взаимодействие молекулы с электрическим полем определяется её суммарным дипольным моментом, состоящим из двух вкладов: постоянного и наведенного. Например, у ДНК постоянный вклад весьма мал, т.к. ее спирали антипараллельны и их постоянные моменты взаимно компенсируются, а вот наведенный дипольный момент бывает большим.  $\alpha$ -Спирали полипептидов обладают большим постоянным дипольным моментом, т.к. складываются вклады от взаимно ориентированных аминокислотных остатков.

При наложении постоянного электрического поля  $E$  на раствор и достижении равновесного состояния  $\Delta n = n \cdot K \cdot E^2$ ,  $n$  – показатель преломления раствора при  $E = 0$ ,  $K$  – константа Керра.  $K$  зависит от произведения двух множителей, первый характеризует оптические свойства исследуемой биомолекулы, второй как постоянный, так и наведенный дипольные моменты молекулы.

При включении/отключении электрического поля происходит ориентация/разориентация системы из-за конкуренции ориентирующего воздействия и броуновского движения. Разориентация описывается экспоненциальным спадом. Для описания релаксации жесткой частицы произвольной формы в общем случае необходимо пять времен релаксации  $T_i$ . Для описания вращения эллипсоида обычно достаточно двух. Математические формулы для описания процесса ориентации еще сложнее. Тем не менее, в рамках определенных приближений удастся связать время релаксации и коэффициент вращательной диффузии  $D_{\text{вращ}}$ , который напрямую зависит от размера и формы исследуемой молекулы. В простейшем случае, т.е. шара, все времена релаксации совпадают, и  $D_{\text{вращ}} = 1/6 \cdot T$ .

Описание экспериментальной установки для ДЛП в упрощенном виде таково: луч лазера проходит сквозь поляризатор, затем сквозь ячейку Керра, затем сквозь анализатор и на детектор. Угол между плоскостью поляризатора и направлением электрического поля  $45^\circ$ , между поляризатором и анализатором  $90^\circ$ . Ячейка Керра – это кювета в форме прямоугольной призмы из кварца. Сквозь две противоположные вертикальные плоскопараллельные грани проходит луч, а перпендикулярно к двум другим граням направлено однородное электрическое поле. Форма электрического импульса либо прямоугольная, либо инверсионная. Второй вариант дает некоторое упрощение анализа временной зависимости ориентации-разориентации.

Характерные значения  $T$  для белков от 1 до 100 нс. Стабильные генерация прямоугольных электрических импульсов и регистрация сигналов на столь коротких масштабах времени – одна из основных проблем эксперимента.

Исследования ДЛП позволили оценить размеры и форму ряда белков. Для ДНК получены доказательства того, что эти молекулы, состоящие из 200 или менее пар оснований нуклеотидов, образуют гомологическую серию палочкообразных частиц конечного диаметра, а диапазон более 8000 пар оснований характерен уже для гауссовых клубков.

## 7. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Информация об изменениях энтальпии  $\Delta H$  и энтропии  $\Delta S$  раствора биомолекул важна для понимания термодинамических процессов, происходящих в системе. Получить эту информацию можно на основе экспериментальных измерений температурной зависимости удельной теплоемкости при постоянном давлении  $C_p$  и теоретических расчетов:  $\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p(T) dT$  и  $\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta C_p(T)}{T} dT$ , где  $[T_1; T_2]$  – исследуемый температурный интервал.

Обычно калориметр состоит из двух ячеек, в одной находится растворитель (для биосистем – водный буферный раствор в подавляющем большинстве случаев), а в другой – растворитель с исследуемым образцом. К обеим ячейкам подводится тепло, мощность нагревателя измеряется с высокой точностью. Цель – просканировать заданный температурный интервал с нулевой разностью температур между ячейками. Фиксируя разность мощностей нагревателей ячеек, получаем искомое –  $C_p(T)$ . Вклад биомолекул в теплоемкость раствора на 3 порядка меньше вклада растворителя. Соответственно, необходима чувствительность порядка  $10^{-6}$  для измерений с точностью 0,1%.

Если изучаются белки, то для современных калориметров достаточно 100 мкг, а в некоторых моделях приборов даже 10 нг, при условии хорошей растворимости во всем  $[T_1; T_2]$ . Этот интервал весьма широк:  $[-10; +130]$  °С. Отрицательные температуры нужны при исследовании полного сворачивания  $\alpha$ -спирали белка. Процессы при температурах выше +100 °С исследуются нечасто. Но для особых систем, например, белки гипертермофильных организмов, альтернативы нет. Разумеется, это возможно лишь при повышенном давлении.

Изменение теплоемкости при фазовом переходе включает два вклада: теплоту самого перехода (плавления, денатурации и т.п.) и разницу между теплоемкостями системы в двух состояниях (например, нативном и денатурированном). Первый вклад проявляется на температурной зависимости теплоемкости в виде пика, а второй – как сдвиг базовой линии.

Экспериментально полученную зависимость  $C_p(T)$  анализируют с помощью расчетов энтальпии Вант-Гоффа:  $\Delta H = R \cdot T^2 \cdot \frac{\partial \ln K}{\partial T}$ , где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – температура,  $K$  – константа равновесия:  $K = \frac{[B]}{[A]}$  для одностадийного фазового перехода между двумя

состояниями/компонентами  $A \rightleftharpoons B$ ,  $[A]$  и  $[B]$  – равновесные концентрации этих состояний.

Если рассчитанная энтальпия меньше полученной из эксперимента, то это интерпретируется как доказательство мультидоменности белка, а если больше, то как доказательство межмолекулярных взаимодействий и наличия в растворе димеров, тримеров и прочих олигомеров. Однако даже для мономерных однодоменных белков переход между нативным и денатурированным состояниями идет через интермедиат (промежуточное состояние, предположительно – «расплавленную глобулу»). Процесс денатурации белков со сложной структурой происходит в интервале десятков градусов. Форма экспериментальной зависимости  $C_p(T)$  и ее зависимость от кислотности раствора позволяет моделировать структуру белка. Точнее, соотносить компоненты  $C_p(T)$  и структурные единицы биомолекулы. Составлены таблицы вкладов отдельных аминокислот, пептидных связей, гидратации и пр. в теплоемкость.

Применение калориметрии при изучении структуры нуклеиновых кислот и процессов образования мембран из липидов дает не менее интересную информацию.

Стоит еще упомянуть, что в классическом методе скорость нагревания/охлаждения равна нескольким градусам в минуту по порядку величины. В настоящее время активно развивается сверхбыстрый вариант, в котором скорость изменения температуры выше на семь порядков. Такой подход позволяет детально изучать кинетику чрезвычайно быстрых переходных процессов и обнаруживать новые метастабильные состояния.

### *Литература*

- [1] Сердюк И. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: учебное пособие: в 2 т. / И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи. – М.: КДУ. – 2009.
- [2] Рис Дж. Биология Campbell: в 3 т. / Дж. Рис, Л. Урри, М. Кейн, С. Вассерман, П. Минорски, Р. Джексон. – М.: Диалектика. – 2021.

Подписано в печать