

AMINOSKĀBES KĀ BIOMATERIĀLU FLUORESCĒJOŠIE MARKĪERI

AMINOACIDS LIKE FLUORESCENT MARKERS FOR BIOMATERIALS

Autore: **Elīna SEDLIONOKA**, e-pasts: elina.sedlionoka@gmail.com
 Zin. darba vadītāja: **Jelena KIRILOVA**, VZĶK docente Dr. chem.,
 Daugavpils Universitāte

***Anotācija.** Mūsdienās fluorescentas metodes ir plaši izmantotas vairākās zinātnes un medicīnas nozarēs: luminiscējošie materiāli ir nozīmīgi imunoķīmijā, in situ hibridizācijas fluorescencē, šūnu pētījumos, citoķīmijā, medicīniskos izmeklējumos un citur. Fluorescentā iekrāsošana ir process, kura gaitā notiek fluorofora kovalentā pievienošana pētāmai molekulai. Tagad ir izpētītas vairākās luminiscēntas iezīmes olbaltumvielā, lipīdu un nukleīnskābju vizualizēšanai. Proteīnu vizualizācijai bioķīmijā un bioloģijā plaši izmanto luminiscēntu iezīmi FITC, kura līdzīgi projektā pielietotam marķierim satur izotiocianāta grupējumu, kas spēj reaģēt ar aminogrupām un tādā veidā iezīmēt biomateriālu, kurā ir aminogrupas (amiboskābes, olbaltumvielas u.c.).*

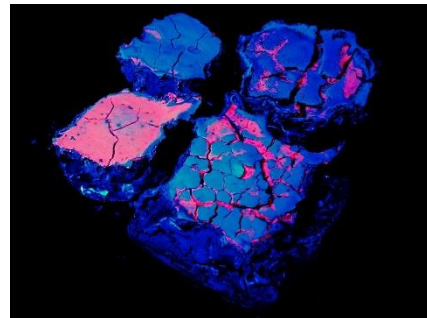
***Atslēgas vārdi:** luminiscence, fluorescēnce, 3-izotiocianobenzantrons, aminoskābe.*

Luminiscēnce kā dabas parādība tika novērota jau ļoti sen. Cilvēki bija novērojuši ziemeļblāzmu, jāntārpiņu un dažu citu kukaiņi, kā arī minerālu spīdēšanu tumsā. Par leģendārā Boloņas akmens (minerāls barīts, bārija sulfāts) spīdēšanu tumsā savā grāmatā jau rakstīja itālis G.C.Lagalla 1612.g. Boloņa akmenim, kā arī citām cietām un šķidrām spīdošām vielām deva nosaukumu “fosfori”. Tagad šādas vielas sauc par **luminoforiem**.



1.att. Ziemeļblāzma

<https://kursors.lv/2018/12/04/ziemeļblazma-tavam-ausim/>



2.att. Boloņa akmens

[flickr.com](https://www.flickr.com/photos/14914470@N00/10000000000/)

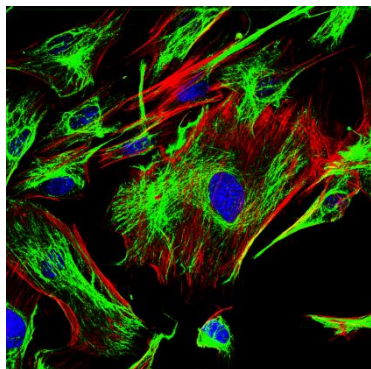
Luminiscēnce ir starojums, kuru ķermenis izstaro papildus termiskajam starojumam un kura ilgums (pēcspīdēšanas laiks) ievērojami pārsniedz gaismas svārstību periodu. (Starojums, kura intensitāte nav atkarīga no starotāja temperatūras). Luminiscēnce, atkarībā no pēcspīdēšanas ilguma dalās uz fluorescēnci un fosforescēnci. Fluorescēnce norisinās ātri, tās ilgums mēdz būt tikai 8-10 sekundes vai nedaudz vairāk. Fosforescēnces gadījumā spīdēšana var turpināties pat vairākas minūtes pēc ierosināšanas beigām. Pēc starojuma ierosināšanā cēloņa luminiscēnci iedala uz fotoluminiscēnci, radioluminiscēnci, rentgenluminiscēnci, elektroluminiscēnci, bioluminiscēnci un hemiluminiscēnci.

Fluorescēnce tiek plaši izmantota mikroskopijā un ir svarīgs instruments īpašu molekulu sadalījuma novērošanai. Lielākā daļa šūnu molekulās nefluorē. Tāpēc tie ir jāmarķē ar fluorescējošām molekulām, ko sauc par fluorohromiem. Interesantas molekulas var tieši marķēt (piemēram, DNS ar DAPI) vai arī tās var imūnatzīmēt ar fluorohromiem, kas ir savienoti ar specifiskām antivielām.

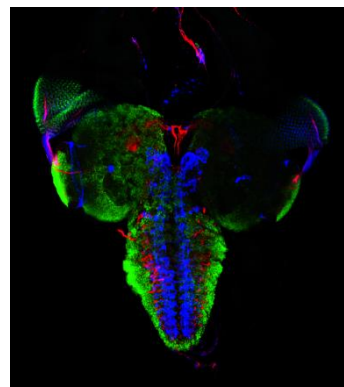
Fluorescēnces mikroskopija arī ļauj attēlot dzīvās šūnas vai audus ar laiku. Šim nolūkam interesējošos proteīnus var marķēt ar ģenētiski kodētām fluorescējošām molekulām, piemēram,

GFP (zaļi fluorescējošs proteīns). Interesējošās molekulas (piemēram, Ca^{2+}) var arī marķēt, izmantojot atgriezeniski saistošas sintētiskās krāsvielas (piemēram, fura-2) vai ģenētiski modificētus dabiskos proteīnus (piemēram, GFP atvasinājumus).

Fluorhromi fluorescēs tikai tad, ja tie tiks apgaismoti ar attiecīgā viļņa garuma gaismu. Viļņa garums ir atkarīgs no fluorofora absorbcijas spektra, un ir jāpārlicinās, ka tiek piegādāts atbilstošs enerģijas daudzums, lai elektronus paaugstinātu ierosinātā stāvoklī. Pēc elektronu uzbudinājuma viņi var uzturēties šajā augstas enerģijas stāvoklī tikai ļoti īsu laiku. Kad elektroni atslābina līdz zemes stāvoklim vai citam stāvoklim ar zemāku enerģijas līmeni, enerģija tiek atbrīvota kā fotons. Tā kā šī procesa laikā tiek zaudēta daļa enerģijas, fluorohroms izstaro gaismu ar palielinātu viļņa garumu un zemāku enerģiju, salīdzinot ar absorbēto gaismu.



3.att. Peles fibroblasti, zaļš: F-Actin, FITC, sarkans: tubulīns, Cy5, zils: kodoli, DAPI. 488



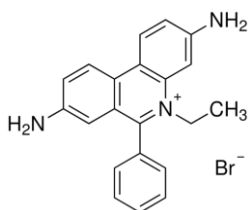
4.att. D. melanogaster kāpuri, zaļi: RNS saistošs proteīns, Alexa

<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/an-introduction-to-fluorescence/>

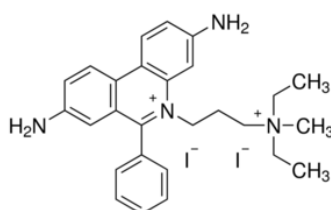
Mikroskopijai visnoderīgākais luminiscences veids ir fluorescence. Fluorhromus var viegli ierosināt ar savu īpatnējo viļņu garumu, izmantojot īpašus gaismas avotus (piemēram, lampas un filtru sistēmas vai lāzerus), un izstaroto gaismu var atšķirt no ierosmes gaismas pēc viļņa garuma (Stokes maiņa).

Izmantojot fluorescences attēlveidošanu, eksperimentētājs var raksturot molekulas daudzumu un lokalizāciju šūnā. Vēl viena fluorescences mikroskopijas priekšrocība ir tā, ka vienlaikus var izmantot vairākus fluorohromus. Fluorhromiem ir jāmainās tikai to ierosmes un emisijas viļņa garumā. Līdz ar to vienlaikus var novērot dažādas mērķa molekulas, kas ļauj veikt ļoti daudz dažādu eksperimentu, piem. jāveic kolokalizācijas pētījumi.

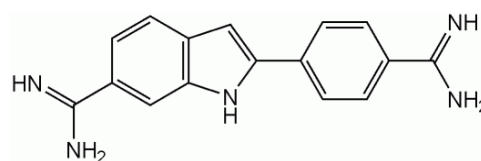
Nukleīnskābju vizualizēšanai tiek plaši izmantotas tādas fluorescentas vielas kā Etīdija Bromīds ar oranžu luminiscenci, Propīdija jodīds ar sarkanu luminiscenci, Crystal Violet, DAPI ar zilu luminiscenci, 7-Aminoactinomycin D. Proteīnu vizualizācijai izmanto Biotīnu, Rhodaminu, Lissaminu un FITC. FITC marķē ar izotiocianāta reaktīvās grupas klātbūtnē, ir jābūt augstai temperatūrai, pH, un augstai proteīnu koncentrācijai. FITC šķīst ūdens šķīdumos.



5.att. Etīdija Bromīds

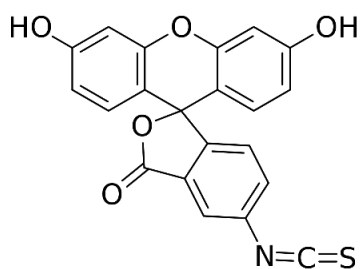


6.att. Propīdija Jodīds



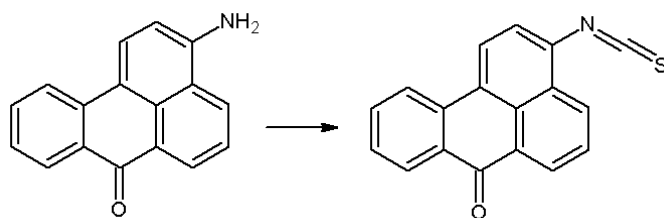
7.att. DAPI

Daugavpils Universitātes zinātnieki plaši pēta un pielieto luminiscentas krāsvielas. Dotais projekts ir šo pētījumu turpinājums un paplašinājums. Projektā ir plānots izmantot bakalaura darbā iepriekš iegūto 3-izotiocianātobenzantronu reakcijās ar aminogupu saturošām molekulām – vairākām aminoskābēm (ar glicīnu, alanīnu, metionīnu u.c.). Pirmkārt tiks atstrādāta šīs vielas sintēzes metode, lai tās sintezēt ar vislielāku iznākumu. Tālāk tiks veikti eksperimenti ar 3-izotiocianātobenzantrona pievienošanas reakcijām pie dažādām aminoskābēm, veidojot kovalentas saites starp iezīmi un biomolekulu. Tādā veidā tiks izpētīta iegūta 3-izotiocianātobenzantrona spēja saistīties ar dažādām bioloģiskajām struktūrām, tiks noteikti to fizikālās un ķīmiskās īpašības, lietojot laboratorijā esošās iekārtas. Iegūtiem savienojumiem tiks veikta hromatomass-spektrometriskā izpēte, kā arī KMR un IK spektru analīze. Iegūtiem aduktiem tiks veikta fotofizikālu īpašību izpēte – gaismas absorbcijas un emisijas spektru uzņemšana. Pēc iegūtiem rezultātiem tiks secināts, vai 3-izotiocianātobenzantrons ir labāks marķieris biomolekulu pētījumiem nekā zināms fluorescentais marķieris FITC un tiks izstrādāta atbilstoša iekrāsošanas procedūra praktiskiem pielietojumiem.



8.att. FITC

Manā pētījumā ir plānots izmantot mana bakalaura darbā iepriekš iegūto 3-izotiocianātobenzantronu reakcijās ar aminogupu saturošām molekulām – vairākām aminoskābēm (ar glicīnu, alanīnu, metionīnu u.c.). Pirmkārt tiks atstrādāta šīs vielas sintēzes metode, lai tās sintezēt ar vislielāko iznākumu. Tālāk tiks veikti eksperimenti ar 3-izotiocianātobenzantrona pievienošanas reakcijām pie dažādām aminoskābēm, veidojot kovalentas saites starp iezīmi un biomolekulu. Tādā veidā tiks izpētīta iegūta 3-izotiocianātobenzantrona spēja saistīties ar dažādām bioloģiskajām struktūrām, tiks noteikti to fizikālās un ķīmiskās īpašības, lietojot laboratorijā esošās iekārtas. Iegūtiem savienojumiem tiks veikta hromatomass-spektrometriskā izpēte, kā arī KMR un IK spektru analīze. Iegūtiem aduktiem tiks veikta fotofizikālu īpašību izpēte – gaismas absorbcijas un emisijas spektru uzņemšana. Pēc iegūtiem rezultātiem tiks secināts, vai 3-izotiocianātobenzantrons ir labāks marķieris biomolekulu pētījumiem nekā zināms fluorescentais marķieris FITC un tiks izstrādāta atbilstoša iekrāsošanas procedūra praktiskiem pielietojumiem. Projektā izstrādātas luminiscentas iezīmes būs demonstrētas dažādos zinātnes komunikācijas pasākumos, piem., Zinātnes festivālā, Zinātnieku naktī. Dalība tajos pasākumos ļaus iepazīstināt un ietuvināt zinātniekus, studējošos un citus pasākuma apmeklētājus ar luminiscentām iezīmēm, tās īpašībām, un tās spēju iesaistīties dažādās bioloģiskajās struktūrās.



9.att. Izotiocianobenzantrona iegūšana

Literatūra

1. An Introduction to Fluorescence, 2011, Wymke Ockenga, Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, Germany,
<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/an-introduction-to-fluorescence/>
2. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Edition, Molecular Probes Handbook, 2010
3. Abdelbasset A.Farahat; Arvind Kumar; Martial Say; Tanja Wenzler; Reto Brun; Ananya Paul; W.David Wilson; David W.Boykin; Exploration of DAPI analogues: Synthesis, antitrypanosomal activity, DNA binding and fluorescence properties; European Journal of Medicinal Chemistry; 2017