КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД И КАПИЛЛЯРНЫЙ ТИТРАЦИОННЫЙ КАЛОРИМЕТР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Котельников Г.В. к.т.н., Моисеева С.П. к.т.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН

gvkotelnikov@yandex.ru

Научные основы метода и калориметра являются результатом диссертационного исследования С.П.Моисеевой (диссертация защищена в Российской химико-технологическом университете им. Д.И.Менделеева в 2005 году). На рис.1 представлен экспериментальный образец капиллярного титрационного калориметра (КТД-2156), разработанный и изготовленный в Институте биологического приборостроения РАН.

Практическое использование КТД-2156 показало его конкурентные преимущества перед лучшими аналогами. Данный калориметр превосходит лучшие аналоги благодаря обеспечению возможности работы с короткоживущими объектами, а также за счет обеспечения работы с лигандами, отличающимися по плотности от исследуемых образцов. КТД-2156 перспективен для внутреннего и внешнего рынков. Обеспечена патентная защита новых научно-технических решений. Отдельные решения являются Know-How

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ КАМЕРЫ ИЗ ЗОЛОТА С ТЕПЛОВЫМИ ШУНТАМИ

Капиллярные калориметрические камеры КТД-2156 (рис.2) расположены горизонтально. Рабочий объем камер ограничен нижней кромкой пассивного теплового шунта. Активный тепловой шунт предотвращает проникновение в рабочий объем камер внешних тепловых потоков по стенкам камер, а также обеспечивает нагрев реагентов добавок до температуры рабочих камер при их введении в камеры.

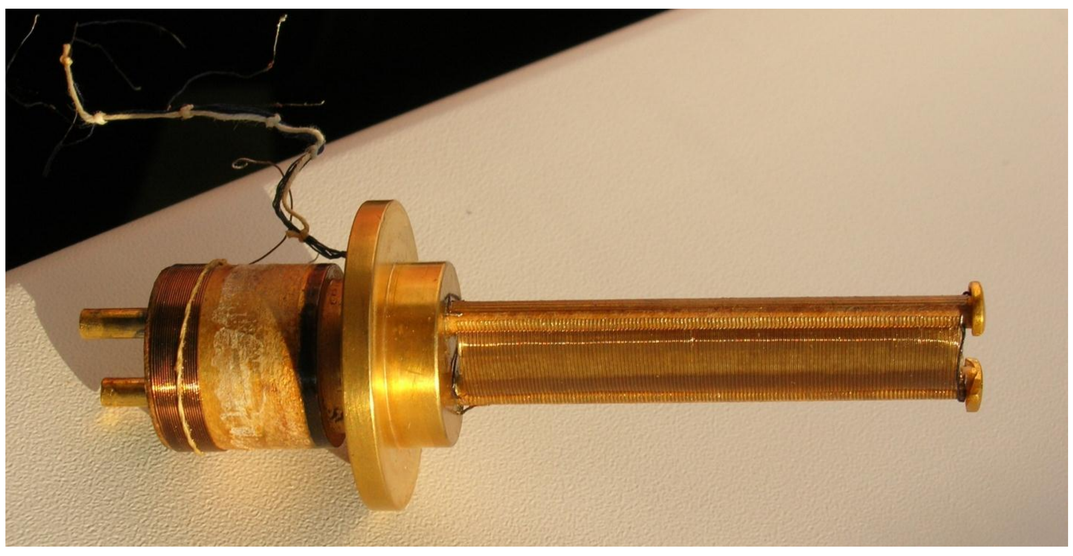


Рис.2

Эти качества прибора позволили специалистам ИБП РАН и ИТЭБ РАН впервые в мировой практике зарегистрировать тепловые процессы трансформации энергии в митохондриях [STUDYING DISPERSOID SYSTEMS Method of introducing an injecting needle into calorimetric chamber of capillary titration calorimeter / G.V.Kotelnikov, Sophia P. Moiseyeva, E. V. Mezhburd, E. I. Maevsky and Elena V. Grishina // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.- 2005.-Vol.81.-P.255–259.].

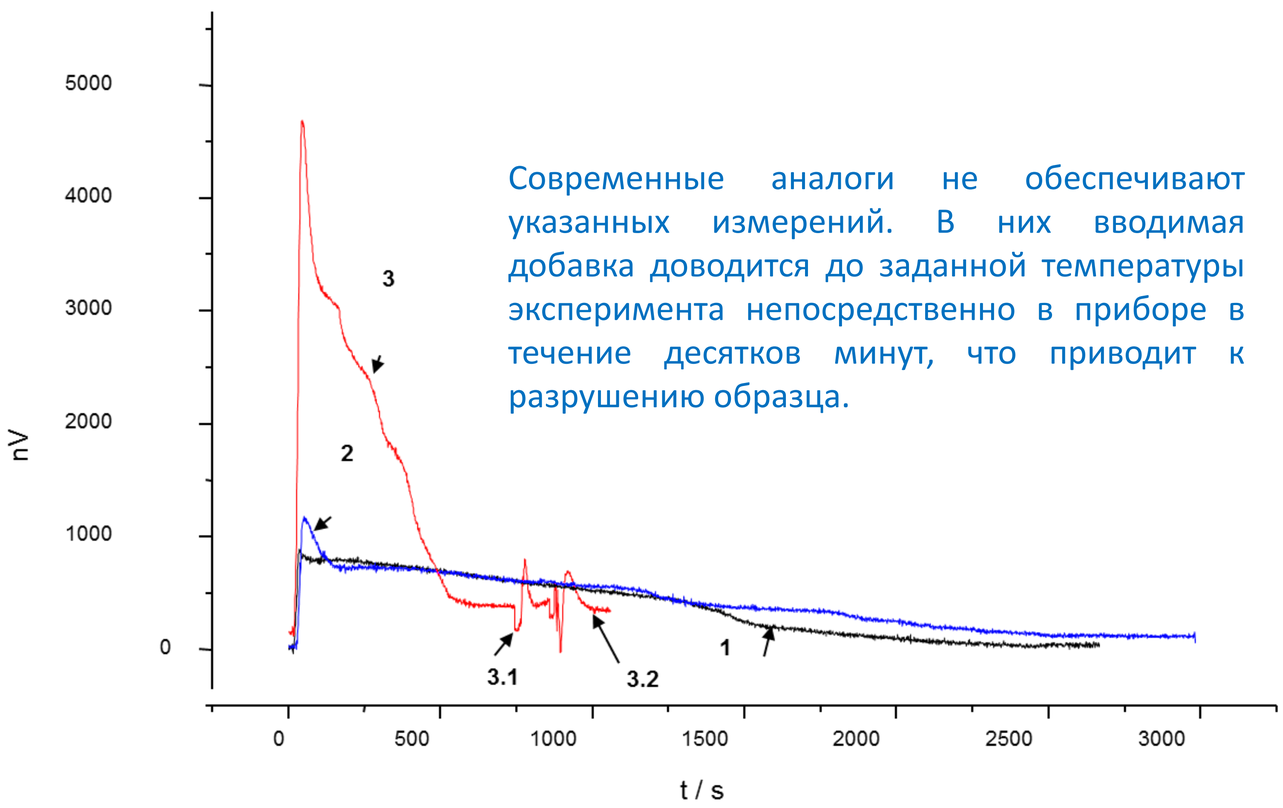
На рис. 3 представлены кривые трансформации энергии в митохондриях. Температура: 26 ºС; частота перемешивания: 20 Гц; амплитуда: 1мм; скорость перемещения иглы при введении добавки в камеру: 2мм/с; объем образца: 156 мкл (камеры из золотых капилляров); добавка: 2 мкл; перед экспериментом добавка сохранялась в холодильнике. Время между забором добавки и ее инъекцией в камеру составляет 60 с.

Добавка: Митохондрия печени крысы (белок 1мг/мл).

Среда: KCl 125 mM, KH_2PO_4 3mM, $MgSO_4$ 1mM, HEPES 10mM, EGTA 0.25 mM pH 7.4.

Субстрат: калия сукцинат 5mM, калия глутамат 0.25 mM.

1: среда + субстрат + МХ; 2: среда + субстрат + МХ + АДФ; 3: среда + субстрат + МХ + ClCCP; 3.1 + среда 2 мкл; 3.2 + АТФ 1.3mM 2мкл



Современные аналоги не обеспечивают указанных измерений. В них вводимая добавка доводится до заданной температуры эксперимента непосредственно в приборе в течение десятков минут, что приводит к разрушению образца.

Рис.3

Максимальная скорость введения добавки определяется выражением (1) и равна 13.7мм/с.

$$\upsilon_{кр} = \frac{\alpha \cdot F \cdot H_ш}{2C_{иг}}$$

где α - коэффициент теплоотдачи от иглы к шунту на высоте $H_ш$; F - площадь иглы в зоне контакта с активным тепловым шунтом высотой $H_ш$; $C_{иг}$ - теплоемкость части иглы высотой, равной высоте активного шунта ($H_ш$).

Данные измерения, выполненные на КТД-2156, открывают широкие перспективы для изучения физических механизмов трансформации и диссипации энергии в митохондриях при свободно-радикальном окислении, что является одной из важнейших задач биологии.

Рис.1

ПЕРЕМЕШИВАНИЕ РЕАГЕНТОВ В КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ КАМЕРЕ

Теоретически обосновано и экспериментально подтверждено эффективное смешивание реагентов в капиллярной камере за счет концентрационной диффузии при введении по всей длине рабочего объема добавки в виде тонкого слоя, который остается в процессе дозирования реагента при перемещении дозирующей иглы.

Экспериментально показано, что фактическое время смешивания реагентов в капиллярной камере соответствует теоретическому расчету (2) и составляет величину порядка 37с.

$$\tau = \frac{R_0^2}{2D_k}\left(1-\frac{V_d}{V_k}\right)\ln\left[\frac{1}{k}\left(\frac{V_k}{V_d}-1\right)\right]$$

где V_d - объем жгута (дозы титранта); R_0 - радиус жгута; V_k - рабочий объем калориметрической камеры; τ - время выравнивания концентрации лиганда по образцу в рабочем объеме калориметрической камеры; D_k. - коэффициент диффузии титранта в образце.

Дополнительное механическое перемешивание за счет принудительных колебаний дозирующей иглы сокращает время смешивания на порядок. На титрационном калориметре выполнено исследование «Комплексы включения, образуемые додецилсульфатом натрия и циклодекстриновыми нанотрубками» специалистами ИБП РАН и МГУ [Комплексы включения, образуемые додецилсульфатом натрия и циклодекстриновыми нанотрубками / Калашников Ф.А., Котельников Г.В., Моисеева С.П., Топчиева И.Н. // Коллоидный журнал.- 2004.-Т.66, №5.- С.608–612.]. Работа посвящена изучению трубчатых наноструктур

Попытки провести эти исследования на зарубежных титрационных калориметрах оказались неудачными, т.к. указанные реагенты имеют существенные отличия по плотности и в калориметрических камерах современных аналогов не перемешиваются, т.к. более легкий лиганд не проникает внутрь образца, а остается в верхней части камеры даже при интенсивном перемешивании.

В капиллярной камере КТД-2156 добавка лиганда располагается тонким слоем по всей длине калориметрической камеры и за счет механического перемешивания обеспечивается необходимый контакт между лигандом и образцом. Это является важным преимуществом КТД-2156 перед аналогами.

ПАРАМЕТРЫ И ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОКАЛОРИМЕТРА

Процессы связывания

n - стехиометрия реакции; К константа связывания, определяющая свободную энергию Гиббса, где ΔG = - RT· ln K; ΔH - энтальпия связывания; ΔG = ΔH - TΔS вклад энтальпии и энтропии в свободную энергию Гиббса

Ферментативные реакции

k_{cat} - константа скорости катализа; K_m - константа Михаэлиса

Технические характеристики

Измерительный объем – 156 мкл; Объем добавки титранта – (1-10) мкл;

Чувствительность – 50 нВт; Температурный диапазон – (5 – 50)°С

Режимы работы Изотермический

Получение на КТД-2156 в исследовательской практике ряда указанных параметров и характеристик можно увидеть, например, в материалах статьи о возрастании активности белковоподобного сополимера по отношению к эфирному субстрату при температуре выше температуры конформационного перехода [Энергетика связывания ионов Cu(II) термочувствительными сополимерами N-винилкапролактама с N-винилимидазолом в различных конформационных состояниях макромолекул / Т.В. Бурова, Н.В. Гринберг, В.И. Лозинский, С.П. Моисеева, Г.В. Котельников, В.Я. Гринберг, А.Р. Хохлов // Высокомолекулярные соединения.- 2010.-Т.52.-С.554-560], а также в других научных публикациях.