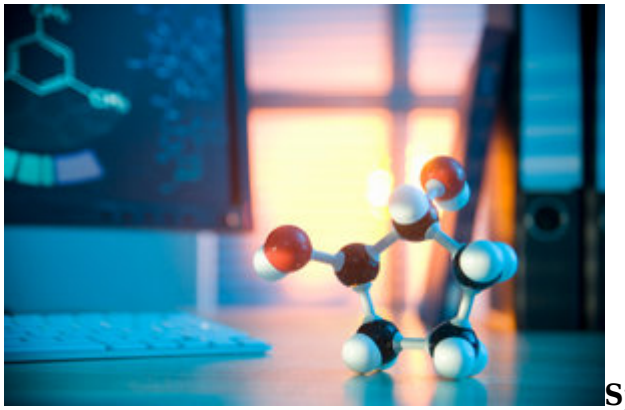
Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Elektronowy rezonans magnetyczny i jego zastosowanie w próbkach biologicznych



Spektroskopia EPR jest techniką umożliwiającą uzyskanie cennych informacji dotyczących różnorodnych układów paramagnetycznych, tj. z niesparowanym elektronem, będących obiektem zainteresowania biologów i lekarzy. Jest to metoda bardzo specyficzna pozwala na badania wolnych rodników w różnych próbkach, nawet bardzo złożonych: komórkach, tkankach, płynach ustrojowych.

Elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR, ang. Electron Paramagnetic Resonance) jest metodą spektroskopową pozwalającą na badanie substancji zawierających centra paramagnetyczne. Zastosowanie tej metody do badań próbek biologicznych wynika z kilku zalet tej metody:

- wysoka czułość (próbki biologiczne zawierają znikome ilości związków badanych); należy pamiętać, ze czułość ta spada w odniesieniu do próbek zawierających dużą ilość wody; czułość aparatu zwiększa się poprzez obniżenie temperatury pomiaru lub liofilizację próbki
- możliwość pomiaru określonego związku w obecności wielu innych niezidentyfikowanych związków (selektywność metody)
- krótki czas pomiaru,
- nieskomplikowaną preparatykę próbek
- mierzone sygnały pochodzą najczęściej od trwałych wolnych rodników np. semichinonowych lub askorbinianowych

Jeżeli badania przeprowadzane są na komórkach należy pamiętać, iż sygnał EPR będzie zależny od fazy wzrostu komórek i ich fazy cyklu komórkowego. Dane literaturowe dowodzą iż maksimum rodników obserwuje się pod koniec fazy S i na początku mitozy [1].

Elektronowy rezonans paramagnetyczny

Elektronowy rezonans paramagnetyczny jest związany ze zmianą orientacji spinu elektronowego w zewnętrznym polu magnetycznym, wywołanego absorpcją energii pola wysokiej częstości. Zjawisko to obserwuje sie w atomach, cząsteczkach i kompleksach molekularnych posiadających niesparowane spinowe momenty magnetyczne μs, tworzące centra paramagnetyczne badanych związków. W próbkach biologicznych najczęściej takim centrum paramagnetycznym jest atom żelaza.

Moment magnetyczny μs i spin elektronu S centrum paramagnetycznego są kolinearne, ale przeciwnie skierowane:

$\mu s = -g\ \mu B S$
μs – magneton Bohra ($9{,}27 \times 10^{-24}$ $J \times T^{-1}$)
g – współczynnik zeemanowskiego rozszczepienia

Współczynnik rozszczepienia g określa udział orbitalnego momentu magnetycznego w całkowitym momencie μ danego centrum paramagnetycznego.

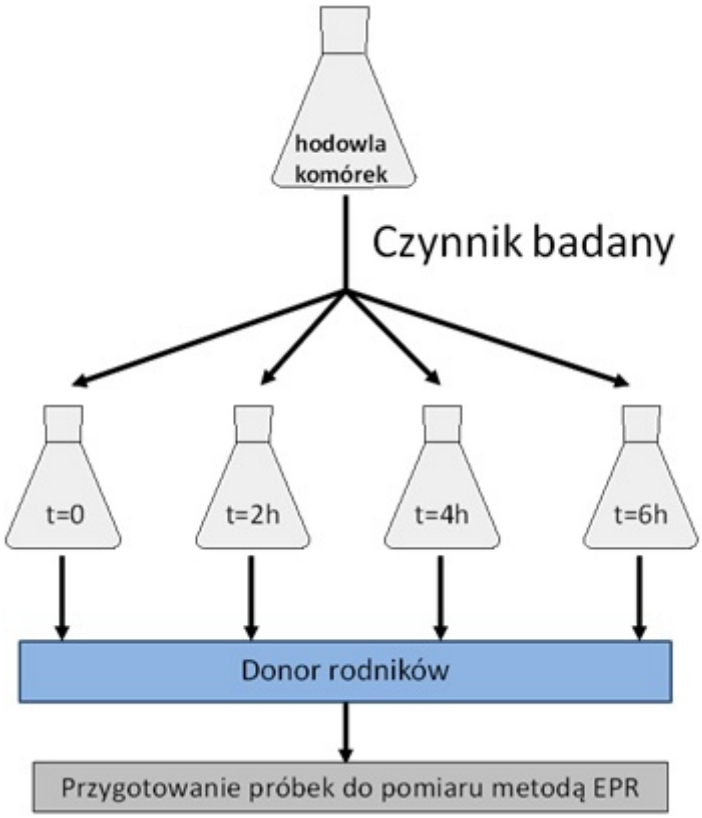
W próbkach biologicznych najczęściej obserwowane spiny to S=1/2 oraz S=3/2. Analiza spinu S=1/2 wartości magnetycznej liczby spinowej wynoszą: m_s=+1/2 i m_s=-1/2. Ze względu na dwie przeciwne orientacje spinu w polu magnetycznym możliwe są dwa poziomy energetyczne: $W_{+1/2}$=½gμ_BB i $W_{-1/2}$ =-½gμ_BB, różnica energii ($\Delta W = W_{+1/2}-W_{-1/2}$) tych poziomów rośnie wraz z przyłożonym polem magnetycznym B. Zmiana orientacji spinu nastąpi, gdy zostanie spełniony warunek rezonansu $\Delta W=hf$, czyli zostanie dostarczona energia równa różnicy energetycznej dwóch poziomów. Amplituda sygnału obserwowanego w rejestratorze jest miarą absorpcji mocy mikrofal wywołanej zmianą orientacji spinu elektronów względem kierunku stałego pola magnetycznego [2].

Widma EPR można wykonać nawet na starych aparatach typu Bruker ESP 300. Pomiary te przeprowadza się w temp. 77K, przy mocy mikrofalowej 1 mW, częstości 9,31 GHz, amplitudzie modulacji 3,027 G i stałej czasowej 41 ms (warunki optymalne). Ze względu na niewielką intensywność sygnału EPR wykrywanego w materiałach biologicznych (komórki, homogenizaty, frakcje) badane próbki należy skanować wielokrotnie. W ten sposób poprawiamy stosunek sygnał: szum.

Do identyfikacji sygnału EPR pochodzącego z próbek biologicznych używa się symulacji wykonanych za pomocą programu w który zaopatrzony jest aparat np. Symfonia 1.25 (Bruker Analytisch Messtechnik, DE), co umożliwiło wyznaczenie parametrów widma (współczynnik rozszczepienia spektroskopowego – g, szerokości składowych). Za parametr wyznaczający intensywność sygnału przyjmuje się wartość integrału absorpcji. Otrzymany sygnał EPR dwukrotnie całkuje się, w celu otrzymania wyników ilościowych spinu. Do przekształceń matematycznych można użyć dowolnych programów chociażby - program Microsoft Excel. Wyniki należy powtórzyć, aby móc przeprowadzić analizę statystyczną np. zastosowanie testu t-Studenta. Warto w próbkach biologicznych wydzielić niewielką ilość badanej próbki w celu określenia białka. Następnie sygnał EPR przeliczyć na poziom białka, standaryzuje to pomiar i niweluje błąd osobniczy (różna ilość biomolekuł w każdej komórce).

Przygotowanie próbek biologicznych [3]

Stałą objętość (np. 50 ml) hodowli komórek w fazie wzrostu logarytmicznego o gęstości około 7x105 komórek/ml traktuje się czynnikiem, które wpływ chcemy zbadać. Traktowanie badanym czynnikiem możemy uzależnić od czasu inkubacji (Rysunek 1). Następnie do tak traktowanej hodowli wprowadza się odczynnik donorowy. Odczynnikiem donorowym jest związek, który rozpada się dając rodnik reagujący z biomolekułami w komórce powodując tym samym powstanie związku paramagnetycznego, którego detekcja jest możliwa metodą EPR. Odczynnik donorowy ma ściśle określoną kinetykę rozpadu, dzięki czemu przy wprowadzeniu odpowiedniego stężenia donoru znane jest stężenie końcowe powstałego rodnika. Bardzo ważne jest zachowanie odpowiedniego (stałego) czasu inkubacji próbek biologicznych z donorem.



Rysunek 1. Przykładowe przygotowanie próbek biologicznych do detekcji rodników metodą EPR

Po wprowadzeniu donoru rodników i inkubacji, z próbki należy pozbyć się dodatkowych czynników rozcieńczających próbkę. Jeśli doświadczenie przeprowadzane było na komórkach usuwamy z próbki pożywkę: wirując próbki, dekantujac i przemywając kilkakrotnie buforem. Zagęszczone próbki wprowadzamy do rurek EPR-owskich. Usuwając powstałe pęcherzyki powietrza.

Biologiczne zastosowanie metody EPR [4]

1. Badanie mechanizmu działania leków
2. Badanie rodnikowych produktów sterylizacji radiacyjnej
3. Kontrolowane uwalnianie leku
4. Oksymetria EPR
5. Badanie statusu redoks w organizmie
6. Procesy metaboliczne o mechanizmie rodnikowym
7. Badanie struktury enzymów z centrum paramagnetycznym

Autor: Karolina Wójciuk

Literatura:

[1] Bartosz G. 2009. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN.
[2] Stankowski J., Hilczer W. 2005. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Wydawnictwo Naukowe PWN
[3] Wójciuk K. 2011. Wpływ ligandów o dużej masie cząsteczkowej na powstawanie dinitrozylowych kompleksów żelaza. Praca doktorska. Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie

[4] Zawada K. 2009. Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie. Zakład Chemii Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Analiza farmaceutyczna Tom 65, nr 3, 2009

http://laboratoria.net/artykul/19840.html
Informacje dnia: Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Palacze mają w brzuchu więcej tłuszczu Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Palacze mają w brzuchu więcej tłuszczu Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Palacze mają w brzuchu więcej tłuszczu

Partnerzy