

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского**

**Фотобиология. Раздел большого практикума  
по биофизике. Часть 1**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией биологического факультета для студентов ННГУ, обучающихся по направлению 020200 «Биология»

Нижний Новгород  
2013

УДК 577.3  
ББК 28.07

Ф81

Ф81 Фотобиология. Раздел большого практикума по биофизике.  
Часть 1: Учебно-методическое пособие / Составители: Мысягин С.А., Сурова Л.  
М, Шерстнева О.Н., Воденеев В.А. – Нижний Новгород: Нижегородский гос-  
университет, 2013. – 32 с.

Рецензент: д.б.н., профессор **А.С. Корягин**

В настоящем пособии представлены теоретические основы и практические задания по оптическим методам исследования, которые имеют широкое применение в биологических исследованиях.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов старших курсов биологического факультета ННГУ, обучающихся по направлению 020200 «Биология». Пособие также представляет интерес для студентов других естественнонаучных и медицинских специальностей при изучении оптических методов исследования биологических объектов.

Ответственный за выпуск:  
председатель методической комиссии биологического факультета ННГУ  
д.п.н., профессор И.М. Швец

УДК 577.3  
ББК 28. 07

© Нижегородский государственный университет  
им. Н.И. Лобачевского, 2013

## Содержание

1. Лабораторная работа «Спектрофотометрия».....	4
1.1. Теоретическая часть.....	4
1.2. Практическая часть.....	7
1.3. Задания к лабораторной работе.....	11
2. Лабораторная работа «Флуоресцентный анализ».....	12
2.1. Теоретическая часть.....	12
2.2. Практическая часть.....	20
2.3. Задания к лабораторной работе.....	22
3. Лабораторная работа «Хемилюминесценция биологических объектов».....	23
3.1. Теоретическая часть.....	23
3.2. Практическая часть.....	26
3.3. Задания к лабораторной работе.....	30
Рекомендованная литературы.....	31

# 1. Лабораторная работа «Спектрофотометрия»

## 1.1. Теоретическая часть

Спектрофотометрический анализ является одним из наиболее распространенных методов исследования. Применение этого метода в биологии позволяет судить о качественном составе количественном содержании веществ, о их состоянии в биологических структурах, о строении молекул.

Принцип спектрофотометрии основан на свойстве веществ поглощать свет. Свет как электромагнитное излучение характеризуется тремя основными параметрами: длиной волны ( $\lambda$ ), частотой ( $\nu$ ) и скоростью распространения ( $c$ ). Между этими параметрами существует взаимосвязь:  $c = \nu\lambda$ ,  $\nu = \frac{c}{\lambda}$ .

Поглощения света веществом физический дискретный процесс и происходит порциями – квантами, энергия которых равна:

$$E = h\nu \text{ т.к. } \nu = \frac{c}{\lambda}, \text{ то } E = h\frac{c}{\lambda}$$

где  $h$  – постоянная Планка.

Поглощение света веществом — внутримолекулярный физический процесс. Свет поглощается молекулами (их комплексами, атомами, радикалами, ионами), а не сложными биологическими структурами, такими, например, как ядра, митохондрии, клетки, сетчатка глаза. Исключение составляют лишь полупроводники, у которых в поглощении света участвуют обобществленные энергетические уровни, создающиеся в результате взаимодействия многих центров (атомов, ионов или молекул). Во взаимодействии вещества со светом, связанном с поглощением, проявляются как квантовые (корпускулярные), так и волновые свойства последнего.

Квантовая природа света выражается в том, что вся энергия, заключенная в кванте света, поглощается молекулой сразу (за время порядка  $10^{-14}$  или менее секунд) и без остатка; следовательно, поглощение света веществом представляет собой дискретный, а не непрерывный процесс; волновая - в том, что поглощение света достигается в результате взаимодействия электронного облака молекулы с электрическим вектором световой волны. Взаимодействие магнитного вектора с молекулой пренебрежимо мало.

Физическая реакция поглощения света молекулой вещества ( $M$ ) может быть записана в следующем виде:  $M + h\nu \rightarrow M^*$ , где  $M^*$  - возбужденное состояние молекулы. Возбужденная молекула  $M^*$  не отличается от обычной молекулы  $M$  по химическому составу или строению, но имеет несколько деформированное электронное облако и содержит избыточные запасы энергии. Разница ( $\Delta E$ ) в запасах энергии между  $M$  и  $M^*$  должна равняться энергии поглощенного кванта света, т. е.  $E_{M^*} - E_M = \Delta E = h\nu$ . Отсюда следует, что молекула может поглощать только те кванты, энергиям которых соответствуют тождественные энергетические емкости молекулы ( $\Delta E = h\nu$ ).

Внутренняя энергия молекулы  $M$  ( $M^*$ ) определяется запасом энергии, заключенной в ее электронах ( $E_{эл}$ ), в колебаниях ядер скелета молекулы ( $E_{кол}$ ):  $E =$

$E_{эл} + E_{кол}$ . Возрастание энергии молекул при  $M \rightarrow M^*$ -переходе связано прежде всего с увеличением  $E_{эл}$  и в значительно меньшей степени - с  $E_{кол}$ . Поскольку значения  $E_{эл}$  и  $E_{кол}$ , а следовательно, и  $\Delta E$  молекул квантованы и могут принимать лишь строго определенные дискретные значения, условие совпадения  $\Delta E$  с  $h\nu$  будет выполняться только для определенных длин волн света. Это обстоятельство является одной из основных причин возникновения спектров поглощения вещества.

Переходу  $M + h\nu \rightarrow M^*$  соответствует переброска на более высокий энергетический уровень (орбиту) лишь одного электрона молекулы (фотоэлектрона). Поглощение света - это одно электронный одноквантовый физический процесс.

Чаще всего фотоэлектроном сложных органических молекул является  $\pi$ -электрон, т. е. один из электронов, участвующих в образовании двойных, чаще делокализованных сопряженных связей молекулы:  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход, или  $\pi \rightarrow \pi^*$ -поглощение. Когда в качестве фотоэлектрона выступает электрон одинарной ковалентной локализованной  $\sigma$ -связи между соседними атомами молекулы, говорят о  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходе (поглощении).

Из квантовой механики известно, что чем больше длина пробега электрона, чем «длиннее» его орбита, тем более часто располагаются энергетические уровни. Вполне понятно также, что молекулярная орбита сопряженных  $\pi$ -электронов, охватывающая всю молекулу, намного «длиннее»  $\sigma$ -орбит, опоясывающих лишь два соседних атома. Поэтому  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы определяют обычно поглощение молекул в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, а  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходы - в достаточно коротковолновой области ультрафиолетового спектра. По этой же причине гемоглобин, имеющий обширную  $\pi$ -электронную систему, поглощает в зеленой области спектра, в то время как триптофан, обладающий сравнительно небольшой пространственной делокализацией  $\pi$ -электронов, поглощает в ультрафиолетовой области спектра (при 280 нм).

Для истинных нерассеивающих растворов поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через объект. Если пропустить через слой вещества ( $l$ ), монохроматический свет с интенсивностью  $I_0$ , то после прохождения через вещество его интенсивность уменьшается до  $I$ . Поглощение света веществом для монохроматического света выражается законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l}, \text{ где}$$

$I$  – интенсивность света прошедшего через объект,  $I_0$  – интенсивность света, падающего на объект,  $\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции,  $c$  – концентрация вещества, поглощающего свет,  $l$  – толщина слоя вещества.

Поглотительную способность вещества характеризуют двумя параметрами – пропусканием и оптической плотностью.

Отношение  $I/I_0$  характеризует пропускание света веществом и обозначают –  $T$ , т.е.  $T = \frac{I}{I_0}$ . Эту величину выражают обычно в процентах. Десятичный логарифм отношения  $I_0/I$  называют оптической плотностью ( $D$ ), т.е.  $D = \lg \frac{I_0}{I}$ . Вели-

чина оптической плотности может принимать положительные значения от 0 до  $\infty$ , однако, современные приборы позволяют измерить  $D$  в пределах от 0 до 2. При небольших значениях оптической плотности она, как правило, пропорциональна концентрации вещества:  $D = \varepsilon c l$ .

На этом соотношении основан количественный анализ спектрофотометрии, т.е. измерив оптическую плотность в максимуме поглощения ( $\lambda_{max}$ ), можно рассчитать концентрацию вещества по формуле:

$$c = D \frac{c_0}{D_0}, \text{ где}$$

$D$  – оптическая плотность вещества с неизвестной концентрацией,

$D_0$  – оптическая плотность стандартного образца известной концентрации,

$c_0$  – концентрация стандартного образца.

Свет различных длин волн поглощается веществом в неодинаковой степени. Зависимость оптической плотности от длины волны называют спектром поглощения. Спектр поглощения характеризуется наличием в нем определенных полос (пиков). Каждая полоса характеризуется:

а) положением максимума, которое выражается соответствующей длиной волны ( $\lambda_{max}$ ),

б) высотой пика ( $D_{max}$ ),

в) полушириной полосы (рис. 1).

Спектр поглощения является индивидуальной характеристикой вещества, т.е. определенному веществу соответствует определенный спектр поглощения. На этом основан качественный анализ спектрофотометрии. Форма спектра поглощения зависит не только от типа вещества, но и от его состояния, характера молекулярного окружения. Восстановление, окисление молекул, их агрегация, комплексообразование, изомеризация, изменение полярности окружения – все эти факторы существенно сказываются на форме спектров поглощения, что позволяет, исходя из анализа спектров поглощения, делать определенные выводы о характере состояния исследуемых веществ.

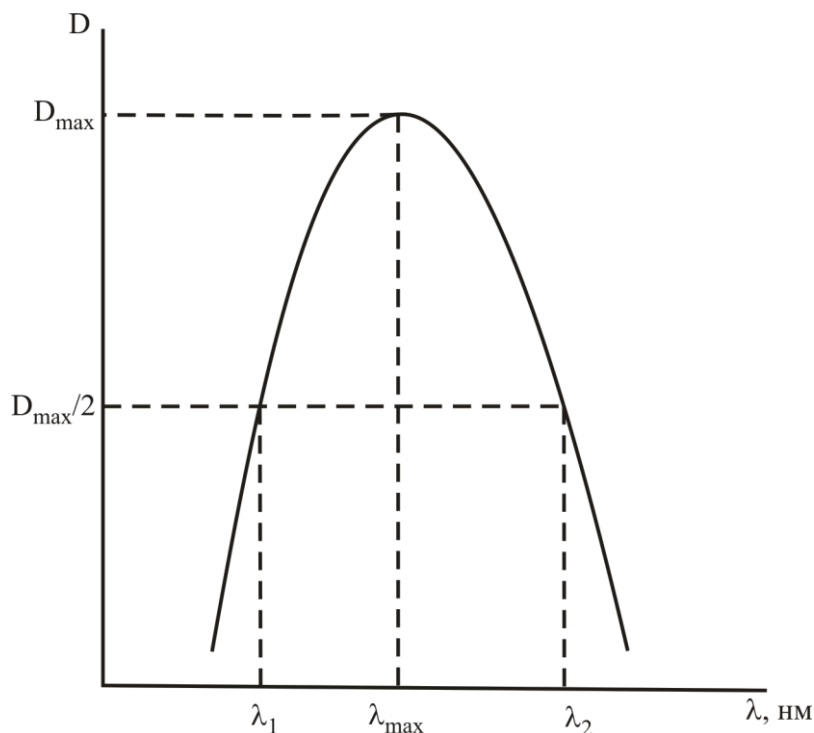


Рис. 1. Спектр поглощения вещества и его основные параметры

## 1.2. Практическая часть

Приборы и материалы: спектрофотометр «СФ-2000», растворы исследуемых веществ (тирозин, триптофан, кокарбоксилаза, альбумин, РНК), дозаторы, мерные колбы, кюветы, весы.

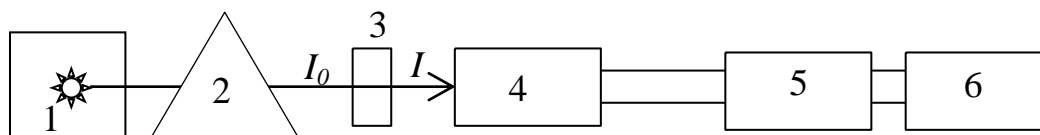


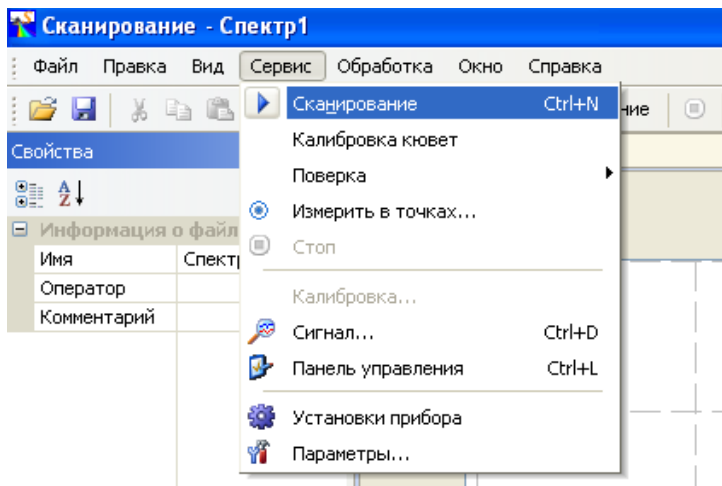
Рис. 2. Оптическая схема однолучевого спектрофотометра. 1 – источник света, 2- монохроматор (призма или дифракционная решетка), 3 – кювета с образцом, 4 – фотоэлемент или ФЭУ, 5 – усилитель, 6 – регистратор

### Включение прибора и порядок измерений

1. Включить сетевой тумблер, находящийся с левой стороны прибора.
2. Запустить программу «Сканирование» с ярлыка на рабочем столе компьютера.
3. Убедиться в наличии связи с компьютером (зеленый индикатор в правом нижнем углу окна).
4. Выполнить прогрев спектрофотометра с включенной лампой соответствующего диапазона (видимый/ультрафиолетовый) в течение 30 минут.

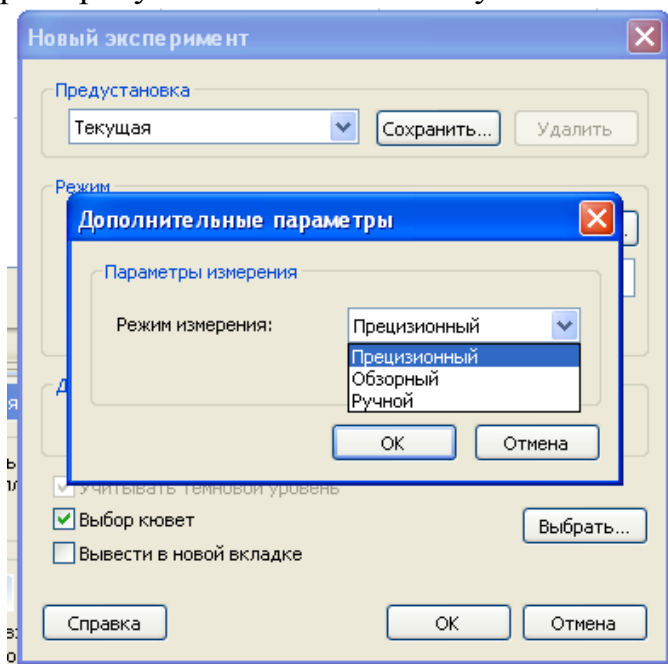
### Снятие спектра поглощения веществ

1. Зайти в меню «Сервис», запустить опцию «Сканирование».

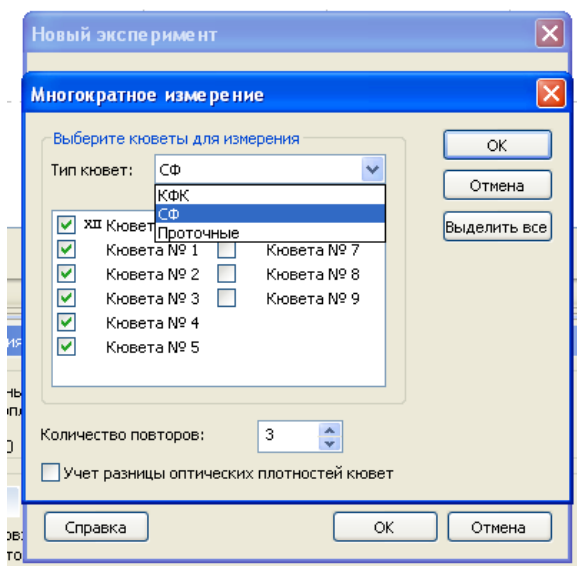


2. Выставить режим измерения «Прецизионный».
3. Ввести в поле «Число циклов накопления» цифру 3.
4. Установить длины волн измерения в требуемом диапазоне с шагом 0,2 нм.

5. На панели «Параметры измерения» в позиции «Тип кювет» выбрать из выпадающего меню вариант «СФ», отметить флажками то количество кювет, которое требуется и нажать кнопку «ОК».





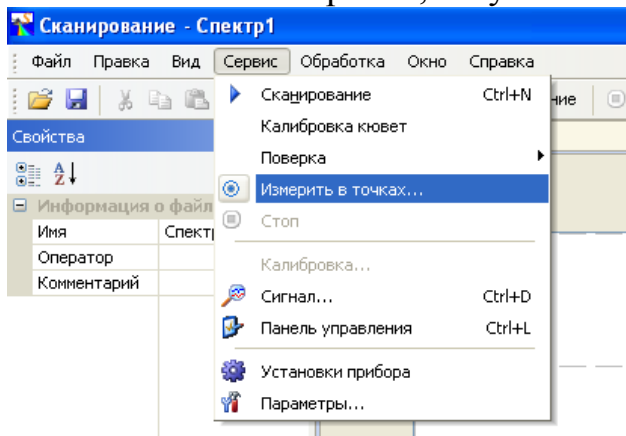


6. Запустить измерение, нажав кнопку «ОК».

7. Для дальнейшей обработки полученных результатов в списке спектров кликнуть по соответствующему спектру правой кнопкой мыши и выбрать пункт «скопировать как текст», скопировать данные в Excel.

### **Измерение оптической плотности при определённой длине волны**

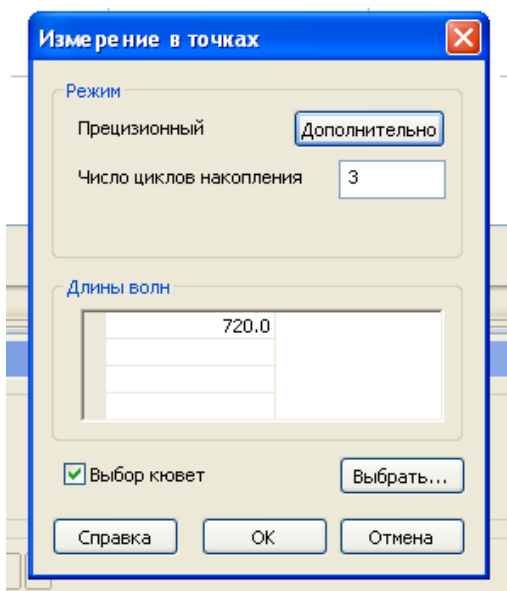
1. Зайти в меню «Сервис», запустить опцию «Измерить в точках».



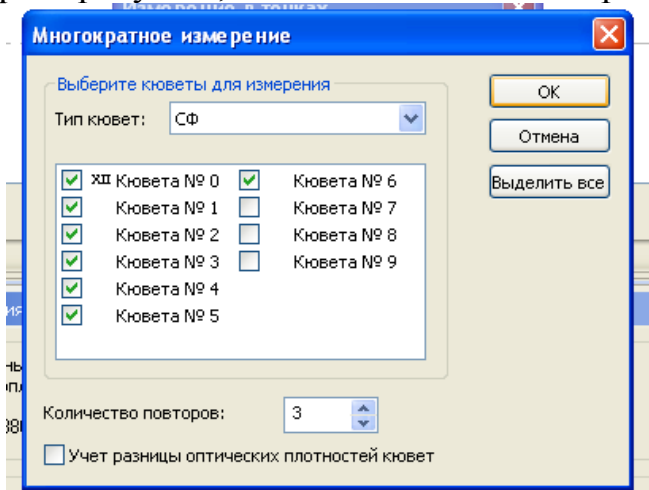
2. Выставить режим измерения «Прецизионный».

3. Ввести в поле «Число циклов накопления» цифру 3.

4. Выбрать длину волны измерения.



5. На панели «Параметры измерения» в позиции «Тип кювет» выбрать из выпадающего меню вариант «СФ», отметить флажками то количество кювет, которое требуется, выставить число повторов – 3 и нажать кнопку «ОК».



7. Запустить измерение, нажав кнопку ОК.

Таблица 1

Типы веществ и их максимумы поглощения

Тип вещества	$\lambda_{max}$ , нм
кокарбоксилаза	246
Тирозин	275
бычий сывороточны альбумин	280
РНК	260

### 1.3. Задания к лабораторной работе

#### **Задание 1. Определение типа вещества по спектру поглощения.**

1. Налить в кюветы по 2 мл раствора исследуемых веществ (аминокислота тирозин, нуклеиновая кислота РНК, белки: бычий сывороточный альбумин и кокарбоксилаза) и поместить их в кюветное отделение спектрофотометра (в качестве холостой пробы использовать дистиллированную воду).

2. Снять спектры поглощения исследуемых веществ в диапазоне от 210 нм до 380 нм с интервалом 0,2 нм.

3. Построить графики зависимости оптической плотности от длины волны, и найти  $\lambda_{\max}$ .

4. Руководствуясь табл.1 определить тип вещества в каждой кювете.

#### **Задание 2. Определение концентрации исследуемого вещества**

1. Приготовить стандартный раствор тирозина в концентрации 0,1 мг/мл, из которого путем последовательного двукратного разведения приготовить еще четыре раствора.

2. Определить оптическую плотность растворов тирозина различных концентраций при  $\lambda_{\max}$ .

3. Построить калибровочную кривую, по которой определить концентрацию раствора тирозина неизвестной концентрации.

## 2. Лабораторная работа «Флуоресцентный анализ»

### 2.1. Теоретическая часть

При поглощении фотона электрон переходит на одну из свободных орбиталей (или на новый энергетический уровень) и молекула оказывается в возбужденном состоянии. Таких уровней может быть несколько, и молекула может оказаться на любом из них, в зависимости от того, какой была длина волны действующего излучения. Обратный переход на основную орбиталь приводит к уменьшению энергии системы, которая может выделиться по частям, растратившись на колебательные движения ядер и поступательное движение молекул растворителя, т. е. теплоту, или же эта энергия возбужденного состояния может выделиться одной порцией в виде кванта люминесценции. Важно отграничить явление люминесценции от других способов излучения света молекулами. Люминесценцией тела в данной спектральной области называют избыток излучения над температурным при условии, что это избыточное излучение обладает конечной длительностью, превышающей период световых колебаний.

Образование электронно-возбужденных молекул может быть не только результатом поглощения ими квантов света, но и следствием химических реакций, электрического разряда и др. Поэтому в зависимости от источника энергии при возбуждении молекул говорят о разных типах люминесценции. Люминесценцию, возникшую в результате освещения молекул, называют фотолюминесценцией. Свечение, сопровождающее химические реакции, — хемилюминесценция; слабая хемилюминесценция сопровождает, например, свободнорадикальное цепное окисление органических соединений, включая липиды. Многие живые организмы, например светляки, бактерии, некоторые морские организмы, способны испускать довольно сильный свет в результате определенных биохимических реакций; такое свечение называют биолюминесценцией. В физике известны явления термолюминесценции, электролюминесценции, сонолюминесценции, триболюминесценции. Эти термины указывают на то, что причиной образования электронно-возбужденных молекул в этих случаях является нагревание образцов, пропускание электрического тока, воздействие ультразвуком, трение поверхностей.

В исходном (невозбужденном) состоянии молекулы находятся на самом нижнем из возможных энергетических уровней, т. е. на нижнем колебательном подуровне основного состояния. У органических молекул, имеющих систему сопряженных двойных связей, это состояние синглетное, при котором спины электронов на верхней заполненной орбитали антипараллельны ( $S_0$ ). В состоянии теплового равновесия с окружающей средой практически все молекулы находятся на самом нижнем колебательном подуровне самого нижнего электронного уровня.

Из основного состояния  $S_0$  молекула может перейти на разные колебательные подуровни вышележащих электронных орбиталей (электронных уровней возбужденного состояния)  $S_1$ ,  $S_2$  и т. д., поглотив фотоны соответствующей

энергии. Таким образом, длина стрелок вверх на рис. 3 соответствует энергиям поглощенных квантов.

Поглощение фотона происходит за время порядка  $10^{-15}$  с, в течение следующих  $10^{-12}$  с устанавливается тепловое равновесие возбужденной молекулы с окружающей средой. В состоянии равновесия относительная заселенность подуровней в возбужденном состоянии, как и в основном, определяется уравнением Больцмана. Поэтому фактически за  $10^{-11}$  с происходит растрата части энергии возбужденного состояния на тепловое движение окружающих молекул (диссипация части энергии фотона в теплоту). На схеме это выглядит как переход *ВК* с разных колебательных подуровней на нижний колебательный подуровень нижнего из возбужденных состояний. В люминесцирующих молекулах возбужденное (синглетное) состояние относительно устойчиво: электрон может находиться на орбитали в возбужденном состоянии до  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  с. В отсутствие переноса энергии на другие молекулы и фотохимической реакции обратный переход возбужденной молекулы в основное состояние может происходить тремя путями.

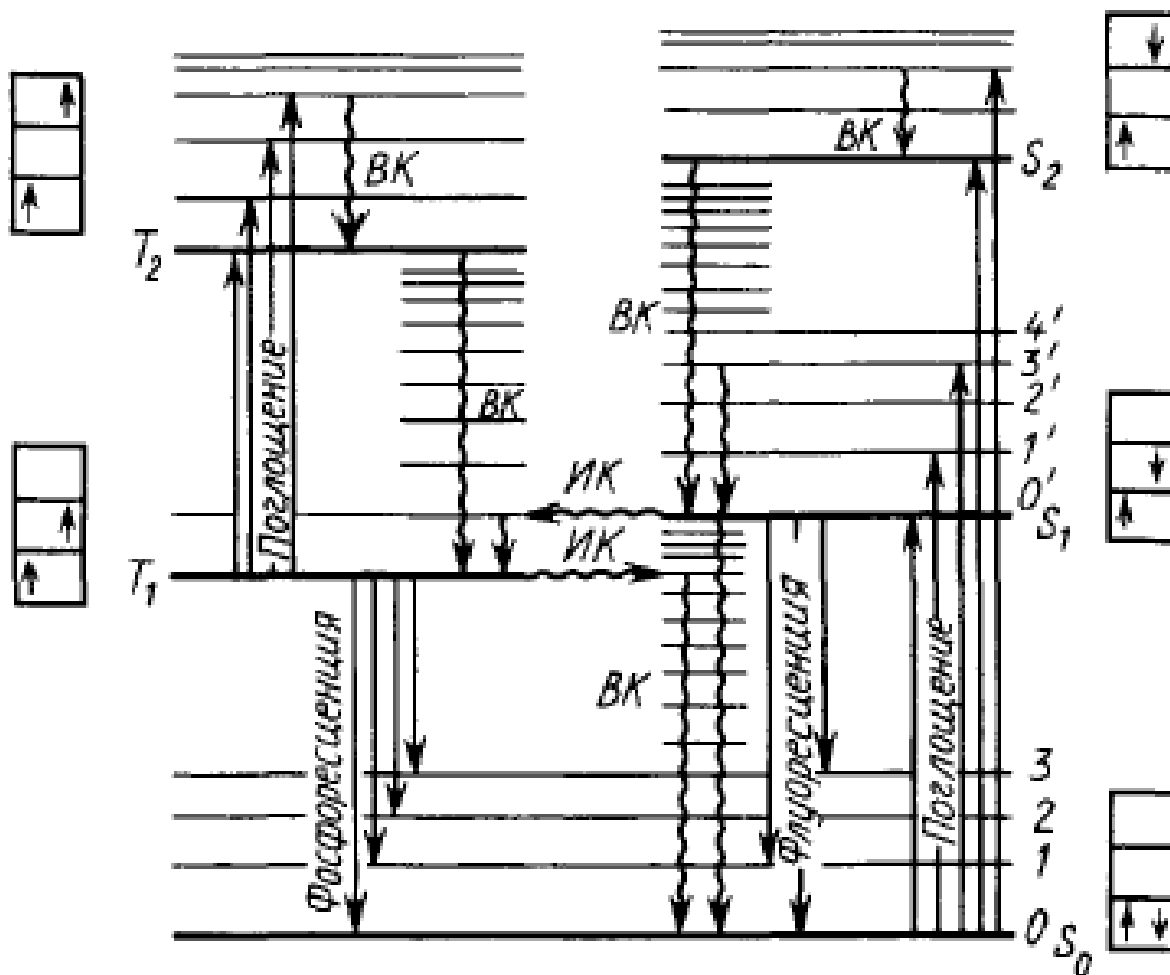


Рис. 3. Электронные переходы в биомолекулах

1. Электрон переходит с орбитали возбужденного состояния  $S_1$  на орбиталь основного состояния  $S_0$ , при этом высвечивается квант света флуоресценции. Так как такой переход может происходить на разные колебательные подуровни

основного состояния, то в спектре флуоресценции возможна тонкая структура, которая размывается в полярных растворителях.

2. Энергия возбужденного состояния постепенно растрачивается на тепловые движения молекул. Квант света при электронном переходе с возбужденного уровня на основной не высвечивается (переход  $BK$  с уровня  $S_1$  на уровень  $S_0$ ). Такой электронный переход называют безызлучательным.

3. Происходит обращение спина электрона на орбитали  $S_1$ . Молекула переходит в триплетное состояние  $T_1$ , энергия которого несколько ниже энергии синглетного. Поскольку прямой переход из триплетного состояния в основное синглетное запрещен, т. е. маловероятен, молекула может находиться в триплетном состоянии сравнительно длительное время от  $10^{-4}$  с до нескольких секунд. При обычных температурах в жидкой фазе за это время происходит тепловая диссипация энергии возбужденного триплетного состояния — безызлучательный переход в основное состояние  $T_1 \rightarrow S_0$ . Но в растворах, замороженных жидким азотом, и даже при комнатных температурах, но в твердых образцах может наблюдаться излучательный переход  $T_1 \rightarrow S_0$ , сопровождающийся высвечиванием кванта фосфоресценции.

Схема позволяет объяснить эмпирические законы люминесценции, которые и послужили основой для создания самой схемы. Это закон Стокса, правило Каши, правило Левшина, закон Вавилова. Остановимся на определении этих законов

Спектром люминесценции (флуоресценции или фосфоресценции) называют зависимость  $I_n = f(\lambda)$ , где  $I_n$  — интенсивность света люминесценции в относительных единицах, измеренная при длине волны  $\lambda$ .

Согласно **закону Стокса** спектр флуоресценции лежит в более длинноволновой области по сравнению со спектром поглощения того же соединения. Это означает, что средняя энергия квантов флуоресценции меньше средней энергии поглощенных квантов. Причина такого явления — это превращение части энергии поглощенного фотона в тепловую энергию окружающих молекул. На какой бы колебательный подуровень ни попал электрон при возбуждении, испускание кванта флуоресценции всегда происходит с нулевого колебательного подуровня синглетного возбужденного состояния ( $S_1^*$ ), т.е. часть энергии электрона рассеивается в тепло.

**Правило Каши** относится к форме спектра флуоресценции при возбуждении объекта светом разных длин волн. Испускание квантов флуоресценции всегда происходит с нижнего возбужденного уровня молекулы, независимо от того, на какой уровень был заброшен перед этим электрон в результате поглощения фотона. Это означает, что какой бы длиной волны ни была возбуждена молекула (разные вертикальные стрелки вверх на схеме), излучение будет происходить из одного и того же состояния молекулы и спектр флуоресценции во всех случаях будет одинаковым. Следовательно, спектр флуоресценции (и фосфоресценции) не зависит от длины волны возбуждающего излучения. Правило Каши и закон Стокса имеют большое значение при проведении спектрофлуориметрических измерений. В соответствии с законом Стокса для возбуждения

люминесценции используют излучение с длинами волн, меньшими коротковолновой границы спектра флуоресценции. Если в растворе люминесцирует одно вещество, то (правило Каши) на форме спектра люминесценции длина волны люминесценции возбуждения не сказывается. Это позволяет использовать спектрофлуориметрию для качественного и количественного анализов люминесцирующих веществ.

**Правило Левшина**, называемое также правилом зеркальной симметрии, утверждает, что спектры флуоресценции по форме зеркально симметричны длинноволновой полосе спектра поглощения, если они построены в шкале частот (энергий). Такое явление можно объяснить тем, что расстояние между колебательными подуровнями и вероятности переходов на них, близки у молекул в основном и в электронно-возбужденном состояниях. Это говорит о том, что геометрия молекул в электронно-возбужденном состоянии мало изменяется по сравнению с основным состоянием. В действительности возбужденные молекулы имеют несколько измененную структуру колебательных подуровней по сравнению с молекулой в основном состоянии, и закон зеркальной симметрии несколько нарушается.

**Закон Вавилова** заключается в том, что квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения люминесценции. Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа квантов, высвеченных в виде люминесценции, к числу поглощенных образцом квантов. Очевидно, что эта величина может принимать значения от 0 до 1. Вероятность перехода молекулы из состояния  $S_0$  в состояние  $S_1$  при поглощении фотона равна единице и не зависит от длины волны поглощенного фотона. Излучательный переход молекулы с нижнего подуровня возбужденного состояния происходит с вероятностью  $\phi$ , меньшей единицы, и сопровождается высвечиванием кванта флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции меньше единицы, поскольку есть некоторая вероятность  $(1-\phi)$  безызлучательных переходов в основное состояние непосредственно или через триплетное состояние, а также других способов растраты энергии.

Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав изучаемой смеси. Необходимо использовать растворы с низкой оптической плотностью ( $D \leq 0,1-0,2$ ), в противном случае требуется учитывать эффекты экранирования и реабсорбции. Как и в случае абсорбционной спектрофотометрии, для идентификации флуоресцирующего вещества наибольшее значение имеют положение максимума, наличие и характер тонкой структуры спектров, полуширина полос флуоресценции. Важная особенность флуоресценции смеси нескольких соединений состоит в том, что спектр смеси изменяется при изменении длины волны возбуждения, поскольку при разных длинах волн могут преимущественно возбуждаться разные соединения.

Перейдем к количественному определению флуоресцирующего вещества в растворе. Предположим, что на кювету с раствором флуоресцирующего веще-

ства падает монохроматический пучок света. Количество поглощенной световой энергии в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера равно  $I_0(1 - T) = I_0 - I10^{-D}$ , где  $D = \epsilon cl$ . Из общего числа поглощенных фотонов часть, равная квантовому выходу флуоресценции  $\varphi$ , высветится образцом в различных направлениях и во всей спектральной области люминесценции. Из этого общего светового потока с помощью светофильтров или монохроматора можно выделить и сфокусировать на приемник света световой поток, который будет зарегистрирован в виде фототока  $I_{\lambda}$ .  $I_{\lambda} = K\varphi I_0(1 - T) = K\varphi I_0(1 - 10^{-\epsilon cl})$ , где интенсивность люминесценции  $I_{\lambda}$  пропорциональна интенсивности возбуждающего света  $I_0$ , квантовому выходу люминесценции  $\varphi$ , коэффициенту поглощения света  $(1 - T)$ . Константа  $K$  зависит от условий измерения флуоресценции.

Из уравнения видно, что интенсивность люминесценции (как и коэффициент поглощения  $1 - T$ ) не пропорциональна концентрации в общем случае. Однако такая пропорциональность соблюдается в образцах с малой оптической плотностью (скажем, при  $D \leq 0,1 - 0,2$ ). При таких условиях можно использовать приближенное выражение для  $I_{\lambda}$  -  $I_{\lambda} \approx I_0 2,3K\varphi D = I_0 2,3K\varphi \epsilon cl$ .

Таким образом, при низких оптических плотностях растворов интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации флуоресцирующего вещества. На этом основан количественный флуоресцентный анализ. Необходимо иметь стандартный раствор определяемого соединения с известной концентрацией  $C_{ст}$ ; измеряются интенсивность флуоресценции такого раствора  $I_{ст}$  и интенсивность флуоресценции исследуемого раствора  $I$ . Концентрация вещества в исследуемом растворе равна -  $C = C_{ст} \frac{I}{I_{ст}}$ .

Условия среды, окружающей флуоресцирующие молекулы, влияют как на спектры поглощения, так и на спектры флуоресценции; наибольшее значение при этом имеет полярность окружающих молекул и их подвижность. В случае флуоресценции растворов веществ наибольшее влияние имеют диэлектрическая проницаемость и вязкость окружающей среды. В табл. 2 даны положения максимумов в спектрах поглощения ( $\lambda_n$ ) и флуоресценции ( $\lambda_{фл}$ ) люминесцирующего соединения диметиламинохалкона (ДМХ) в растворителях с различной полярностью (диэлектрической проницаемостью). Видно, что с увеличением полярности растворителя максимумы в спектре поглощения и, особенно, в спектре флуоресценции сдвигаются в область больших длин волн. Объяснение этому явлению дано на рис. 4.

Молекула ДМХ в основном состоянии имеет относительно небольшой дипольный момент  $\mu_0 = 17 \cdot 10^{-30}$  Кл м и, соответственно, умеренно сольватирована, т. е. окружена ориентированными полярными молекулами растворителя, например воды. Поглощение фотона и переход молекулы в возбужденное состояние сопровождаются увеличением дипольного момента молекулы  $\mu_v = 77 \cdot 10^{-30}$  Кл м. Это приводит к поляризации электронных оболочек окружающих молекул, индукционному смещению их атомов и переориентации окружающих молекул (росту сольватации). Растрата энергии на все эти процессы приводит к длинноволновому сдвигу полосы флуоресценции.



Максимумы поглощения и флуоресценции диметиламинохалкона (ДМХ) в разных растворителях

растворитель	$\epsilon$	$\lambda_n$ , нм	$\lambda_{fl}$ , нм
Гептан	1,9	383	436
Толуол	2,4	402	472
Бутан	17,7	418	545
Метанол	32,7	418	547
Вода	80	427	560

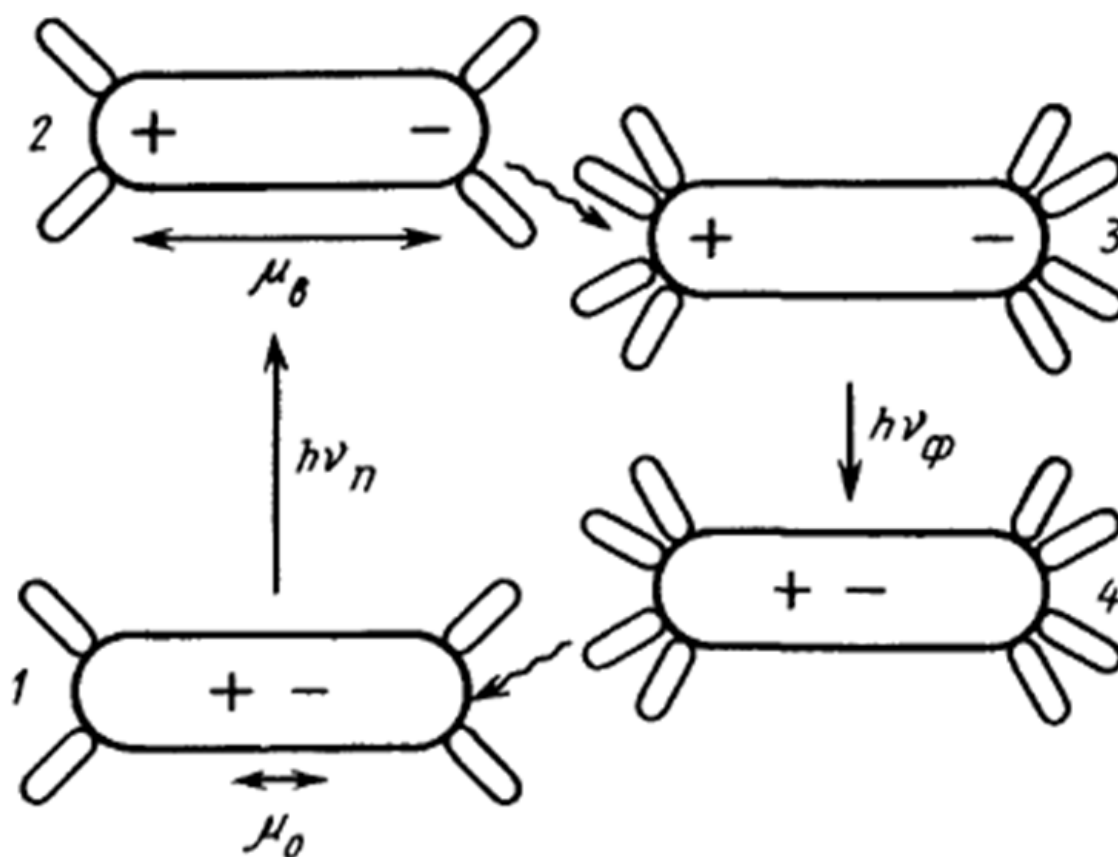


Рис. 4. Изменение дипольного момента и сольватации зонда ДМХ после поглощения фотона или испускания фотона флуоресценции

Таким образом, разница между максимумами поглощения и флуоресценции (сдвиг по закону Стокса) будет выше в случае зондов со значительной разностью  $\mu_v - \mu_0$ , большим временем жизни возбужденного состояния и в маловязкой, полярной среде.

Явление длинноволнового сдвига спектра флуоресценции в полярном, невязком окружении лежит в основе применения флуоресцирующих красителей

(зондов). *Флуоресцентным зондом* называют флуоресцирующую молекулу, которая связывается с белками, биологическими мембранами или другими компонентами клетки нековалентными связями. В качестве зондов используют соединения, параметры люминесценции которых резко меняются в зависимости от свойств среды. Поэтому, зная локализацию зонда в клетке, можно по люминесценции судить о физических свойствах непосредственного микроокружения молекул зонда, т. е. о свойствах белков, мембран, нуклеиновых кислот и других структур клеток. В некоторых случаях компоненты клеток (например, белки, жирные кислоты и т. д.) ковалентно связывают (метят) с флуоресцирующими соединениями, в этих случаях используют термин *флуоресцентные метки*.

Изменение свойств среды, окружающей люминесцирующие молекулы, отражается не только на спектрах, но и на квантовом выходе люминесценции. В некоторых случаях различия в квантовом выходе бывают весьма значительны. Так, например, квантовый выход флуоресценции красителя 1-анилинонафтален-8-сульфоната (АНС) в бутаноле равен 0,66, а в воде - 0,004; соответственно этому время затухания флуоресценции составляет в пропаноле 10,5 нс, а в воде — всего 0,55 нс.

Будучи включенным в липидный слой мембран, краситель показывает довольно высокий квантовый выход флуоресценции  $\phi = 0,29$  и  $\tau = 7,0$  нс. При переходе красителя из водной в мембранную фазу квантовый выход флуоресценции АНС возрастает на  $\sim 2$  порядка. В суспензии мембран флуоресценция красителя обусловлена только той его частью, которая связалась с мембранами (встроилась в липидный слой); это позволяет изучать связывание с липидами (и белками) мембран АНС, который может считаться люминесцентным зондом на наличие гидрофобной фазы. Но, поскольку АНС имеет отрицательный заряд, его связывание с мембранами зависит от поверхностного заряда мембран: с ростом положительного заряда связывание растет, с ростом отрицательного — падает. Тем самым АНС можно использовать также и в качестве зонда на наличие заряда на мембранах и на белковых макромолекулах.

Если возбуждение люминесценции осуществляется монохроматическим светом, то появляется возможность измерить зависимость интенсивности люминесценции от длины волны возбуждающего света. Характер этой зависимости станет ясен при анализе уравнения  $I_{\lambda} = K\phi I_0(1 - T) = K\phi I_0(1 - 10^{-\epsilon cl})$ . Прежде всего, интенсивность люминесценции зависит от интенсивности возбуждающего излучения ( $I_0$ ). Приведенным спектром возбуждения назовем функцию  $I_{\lambda}/I_0 = f(\lambda)$ , где интенсивность монохроматического возбуждающего света  $I_0$  при длине волны  $\lambda$ , выражена числом фотонов/с или эйнштейнов/с.

Из уравнения  $I_{\lambda} = K\phi I_0(1 - T) = K\phi I_0(1 - 10^{-\epsilon cl})$  следует, что  $I_{\lambda}/I_0 = K\phi(1 - T)$ . Поскольку квантовый выход флуоресценции  $\phi$  для конкретного флуоресцирующего вещества, согласно закону Вавилова, от длины волны возбуждения не зависит (равно как и константа  $K$ ), ясно, что форма спектра возбуждения повторяет форму зависимости от длины волны коэффициента поглощения, т. е. функции  $1 - T = f(\lambda)$ . Для образцов с низкой оптической плотностью уравнение  $I_{\lambda} = K\phi I_0(1 - T) = K\phi I_0(1 - 10^{-\epsilon cl})$  переходит в уравнение  $I_{\lambda} =$

$I_0 2,3K\varphi D = I_0 2,3K\varphi \varepsilon c l$ , откуда  $\frac{I}{I_0} \approx 2,3K\varphi D$ , а так как  $\varphi$  и  $K$  - постоянные, то можно сказать, что спектр возбуждения флуоресценции в разбавленных растворах совпадает (по форме) со спектром поглощения флуоресцирующего соединения.

Совпадение спектра возбуждения люминесценции с абсорбционным спектром люминесцирующего соединения может наряду со спектром люминесценции использоваться для идентификации люминесцирующих молекул в системе. Так, спектр возбуждения ультрафиолетовой флуоресценции живых клеток и митохондрий совпадает по форме со спектром поглощения ароматических аминокислот белков. Это говорит о том, что именно белки флуоресцируют в клетках в этой области.

При изучении люминесценции сложных систем, таких, как целые ткани, суспензии клеток, многокомпонентные растворы, могут быть допущены ошибки как при измерении спектров люминесценции. Оптические артефакты, приводящие к искажениям спектров люминесценции и возбуждения люминесценции, связаны в основном с двумя явлениями: *экранирующим эффектом* и *эффектом реабсорбции*, называемыми также *эффектами внутреннего фильтра*.

Эффект экранирования возбуждающего света связан с поглощением части возбуждающего света посторонними веществами, в результате чего уменьшается количество фотонов, поглощаемых исследуемым веществом. Тем самым снижается интенсивность люминесценции.

Реабсорбция — это поглощение квантов люминесценции в толще самого образца. Реабсорбция может происходить в результате поглощения фотонов самим люминесцирующим веществом, при этом будет ослабляться интенсивность люминесценции в коротковолновой части спектра. В многокомпонентных системах фотоны люминесценции могут поглощаться молекулами других веществ, характер искажений спектра люминесценции в таком случае будет полностью определяться формой спектра поглощения веществ в системе. Эффект реабсорбции увеличивается с возрастанием оптической плотности образца. Для уменьшения реабсорбции следует: 1) использовать образцы с низкой оптической плотностью; 2) измерение люминесценции осуществлять с передней стенки; 3) возбуждать люминесценцию в максимуме поглощения вещества.

Всякое снижение квантового выхода флуоресценции может рассматриваться как процесс тушения флуоресценции. Основная причина тушения флуоресценции — взаимодействие молекул флуоресцирующего соединения с другими молекулами в среде, которые можно назвать в общем случае молекулами тушителя. Действие большинства молекул-тушителей основано на возмущении электронных уровней в люминесцирующей молекуле, изменении расстояний между уровнями, увеличении вероятности безызлучательных переходов, в частности в увеличении вероятности  $S_1 \rightarrow T_1$  перехода, который при комнатной температуре сопровождается практически полной тепловой диссипацией энергии возбужденного состояния.

К числу наиболее активных тушителей флуоресценции относятся: 1) тяжелые анионы и катионы  $\Gamma$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (при этом облегчается  $S_1 \rightarrow T_1$  переход);

2) парамагнитные ионы и молекулы  $O_2$ ,  $Mn^{2+}$ , нитроксильные радикалы; 3) молекулы растворителя. Наибольшим тушащим действием обладают обычно полярные растворители, такие, как вода; тушение, по-видимому, связано с облегчением  $S_1 \rightarrow T_1$  перехода в молекуле флуоресцирующего соединения; 4) акцепторы электронной энергии возбуждения.

Следует отметить, что тушащее действие молекул растворителя трудно оценить количественно. Так как люминесценция биологически важных веществ всегда измеряется в том или ином растворителе, можно лишь сравнивать квантовые выходы флуоресценции вещества в разных растворителях. Тушителями в более узком смысле называют поэтому обычно не растворитель, а растворенные в нем молекулы других соединений, с увеличением концентрации которых квантовый выход снижается. Увеличение температуры, как правило, резко снижает квантовый выход и, следовательно, интенсивность люминесценции (температурное тушение люминесценции).

Согласно С. И. Вавилову, тушение флуоресценции молекулами-тушителями может быть статическим (тушение I рода) и динамическим (тушение II рода). Особенностью динамического тушения является параллельное снижение  $\varphi$  и  $\tau$  по мере увеличения концентрации тушителя.

Статическое тушение связано с образованием нефлуоресцирующих комплексов флуоресцирующих молекул с молекулами тушителя.

При статическом тушении не происходит сокращения времени жизни возбужденного состояния; уменьшается лишь доля молекул, обладающих флуоресценцией, но все ее характеристики (кроме квантового выхода) не изменяются. Частным случаем статического тушения является так называемое концентрационное тушение, которое связано с образованием нефлуоресцирующих димеров и более крупных агрегатов молекул при высокой концентрации флуоресцирующего вещества.

## 2.2. Практическая часть

**Приборы и материалы:** спектрофлуориметр «Флюорат-02-Панорама», растворы флуоресцеина, TRIS, MES, дозаторы, мерные колбы, кюветы, весы.

### Регистрация спектра флуоресценции исследуемых веществ

1. Включить прибор тумблером на передней панели. Запустить программу "Panorama Pro" с рабочего стола компьютера.

2. В меню "Измерения" перейти в раздел "Спектральные", выбрать режим сканирования "По регистрации".

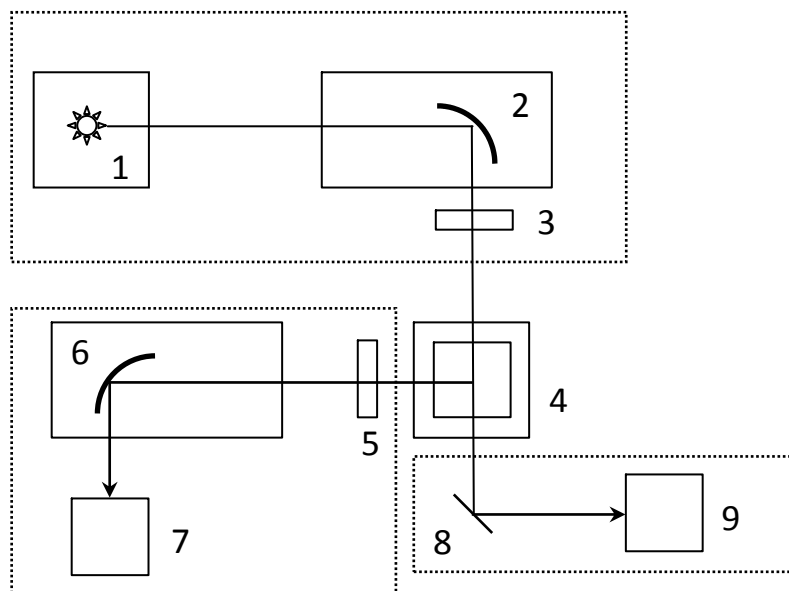
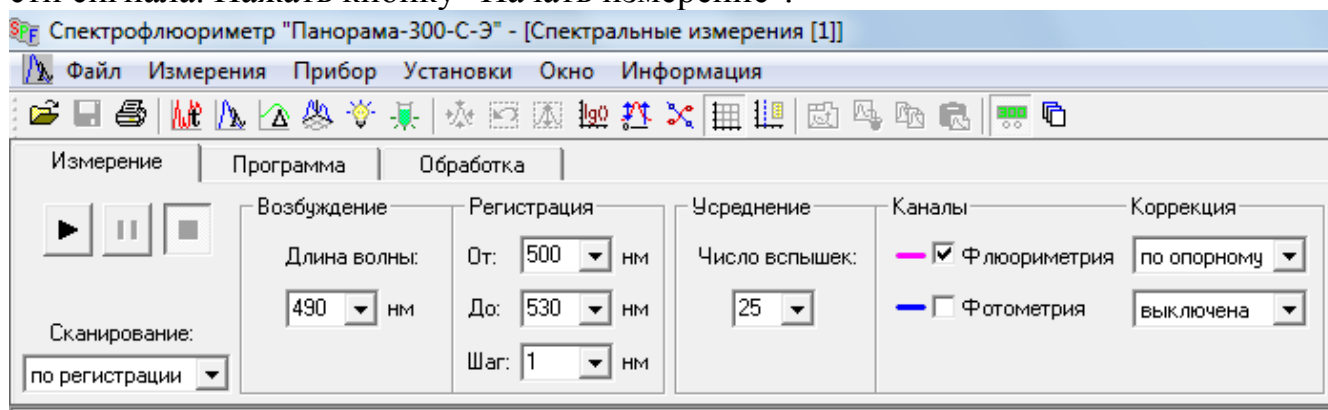


Рис. 5. Оптическая схема спектрофлуориметра. 1 – источник света, 2 – монохроматор осветительного канала (возбуждения), 3 и 5 – светофильтры каналов возбуждения и регистрации люминесценции, 4 – кювета с анализируемой пробой, 6 – монохроматор флуориметрического канала, 7 - фотоприёмник флуориметрического канала (ФЭУ), 8 – светоделительная пластина, 9 - фотоприёмник опорного канала

3. Выставить параметры сканирования: длина волны возбуждения, диапазон регистрации с определенным интервалом, число вспышек лампы. Поставить флажок напротив канала "флуориметрия", коррекция - "по опорному". Установить уровень чувствительности ФЭУ в зависимости от уровня интенсивности сигнала. Нажать кнопку "Начать измерение".



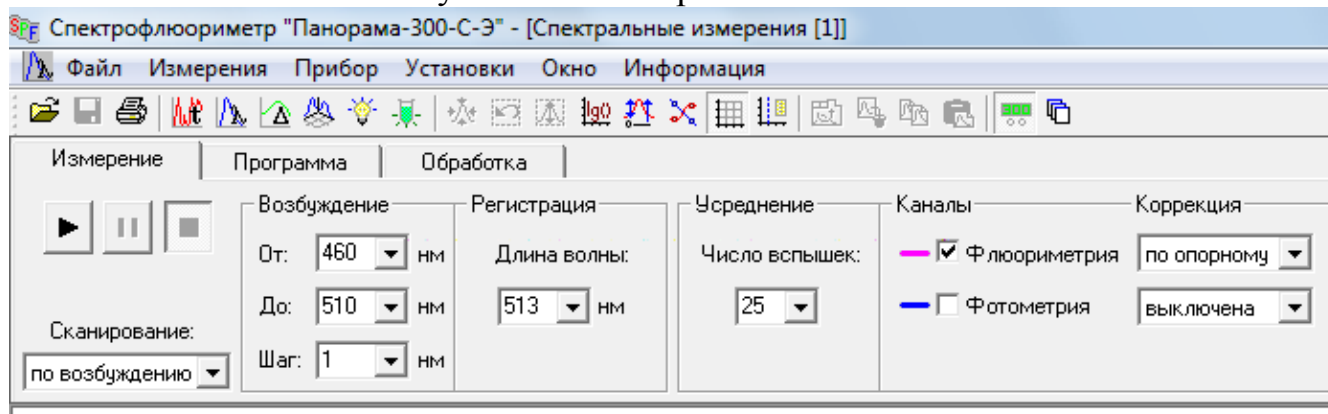
3. Для дальнейшей обработки полученных данных в меню "Файл" нажать "Экспортировать в..." → "Excel".

### Снятие спектра возбуждения флуоресценции

1. В меню "Измерения" перейти в раздел "Спектральные". Режим сканирования "По возбуждению".

2. Выставить параметры сканирования: длина волны регистрации, диапазон возбуждения с определенным интервалом, число вспышек лампы. Поставить флажок напротив канала "флуориметрия", коррекция - "по опорному". Ус-

тановить уровень чувствительности ФЭУ в зависимости от уровня интенсивности сигнала. Нажать кнопку "Начать измерение".



3. Для дальнейшей обработки полученных данных в меню "Файл" нажать "Экспортировать в..." → "Excel".

### 2.3. Задания к лабораторной работе

#### Задание 1. Регистрация спектров флуоресценции флуоресцеина при различных концентрациях раствора

1. Приготовить стандартный раствор флуоресцеина в концентрации  $10^{-4}$  М из которого путем двукратного последовательного разведения развести еще 4 раствора.

2. Снять спектры флуоресценции растворов флуоресцеина различных концентраций при длине волны возбуждения 490 нм в диапазоне от 500 до 540 нм с шагом 1 нм.

3. Построить график зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина в максимуме спектра от концентрации вещества и определить концентрацию раствора флуоресцеина неизвестной концентрации.

#### Задание 2. Регистрация спектров возбуждения флуоресценции флуоресцеина

1. Зарегистрировать спектр возбуждения флуоресценции флуоресцеина при длине волны регистрации 513 нм и диапазоне возбуждения от 460 до 510 нм с шагом 1 нм.

2. Сравнить спектр возбуждения флуоресценции флуоресцеина со спектром флуоресценции.

#### Задание 3. Регистрация спектров флуоресценции флуоресцеина при различных рН раствора

1. Снять спектры флуоресценции растворов флуоресцеина различных рН при длине волны возбуждения 490 нм в диапазоне от 500 до 540 нм с шагом 1 нм.

2. Построить график зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина в максимуме спектра от рН раствора.

3. Определить рН раствора флуоресцеина неизвестного рН.

### 3. Лабораторная работа «Хемилюминесценция биологических объектов»

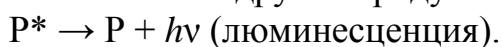
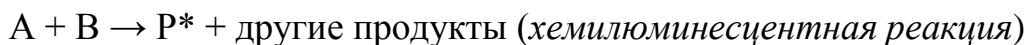
#### 3.1. Теоретическая часть

Свечение, сопровождающее химические реакции, называется хемилюминесценцией. Процессы жизнедеятельности практически всегда сопровождается очень слабым излучением, которое иногда называют сверхслабым свечением или собственным излучением клеток и тканей.

В биологических системах собственная хемилюминесценция в большинстве случаев отличается крайне низкой интенсивностью и требует особо чувствительной аппаратуры для обнаружения. Некоторые вещества (активаторы хемилюминесценции) обладают способностью усиливать интенсивность хемилюминесценции во много тысяч раз.

Собственное свечение тканей может быть обусловлено реакциями трех типов: 1) реакциями, так называемых, активных форм кислорода, 2) реакциями цепного перекисного окисления липидов и 3) реакциями с участием окиси азота.

Наличие свечения означает, что энергия, которая выделяется на одной из стадий химического процесса, протекающего в системе, оказывается достаточной для образования одного из продуктов реакции в электронно-возбужденном состоянии:



Существует несколько причин крайне низкой интенсивности хемилюминесценции, сопровождающей реакции с участием свободных радикалов. Во-первых, сама концентрация радикалов в биологических системах очень мала из-за их высокой химической активности, поэтому малы и скорости реакций, сопровождающихся свечением. Во-вторых, не всякое химическое взаимодействие радикалов приводит к образованию электронно-возбужденных молекул продуктов реакции. В-третьих, даже если и образовалась возбужденная молекула продукта, вероятность того, что высветится квант, а не произойдет растрата энергии в тепло, тоже очень мала.

Таким образом, квантовый выход хемилюминесценции в таких реакциях, как цепное окисление органических молекул (включая, по-видимому, перекисное окисление липидов) имеет порядок величины  $10^{-8}$ .

Применение активаторов хемилюминесценции позволяет существенно усилить ее интенсивность. По механизму действия активаторы распадаются на две четко различающиеся группы, которые можно назвать *химическими* и *физическими* активаторами.

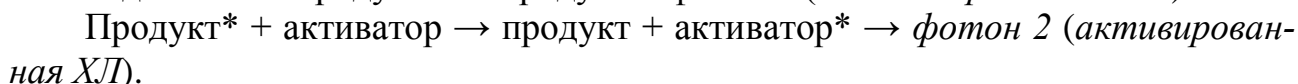
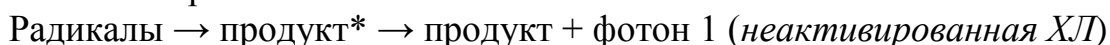
Химические активаторы хемилюминесценции, называемые также ХЛ-зондами, – это соединения, вступающие в реакции с АФК или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов

в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое при этом свечение связано с переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов:



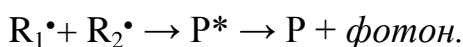
Хорошо известными представителями таких активаторов могут служить люминол и люцигенин.

*Физические активаторы* не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но, тем не менее, многократно усиливают интенсивность ХЛ. В основе их действия лежит физический процесс переноса (миграции) энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор:



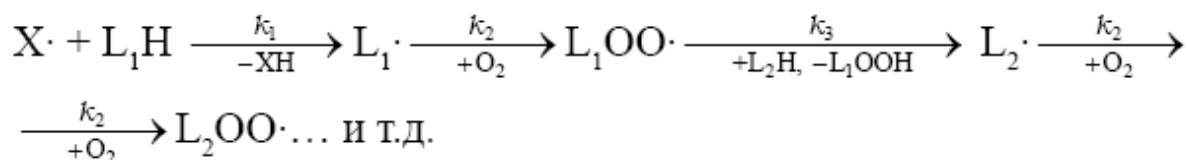
Усиление свечения активатором происходит в том случае, если квантовый выход излучательного перехода (люминесценции) во втором случае выше, чем в первом. Наиболее эффективным физическим активатором ХЛ при перекисном окислении липидов служит производное кумарина С-525; его добавление к системе, где идет реакция, усиливает свечение более, чем в 1500 раз.

Образование возбужденного состояния при взаимодействии свободных радикалов в самом общем виде может быть описано уравнением реакции:



Наиболее распространенная реакция, сопровождающаяся ХЛ в клетках и тканях животных и человека, это реакция перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая представляет собой частный случай реакций цепного окисления органических соединений молекулярным кислородом.

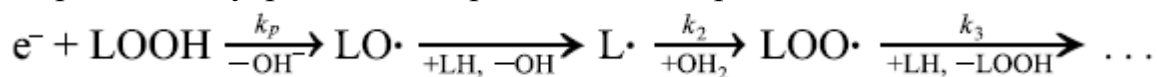
Цепное окисление представляет собой реакцию, субстратами которой служат полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), входящие в состав липидов биологических мембран и липопротеинов (обозначим молекулу LH), и молекулярный кислород, а продуктом – гидропероксиды ПНЖК (LOOH). Реакция начинается при появлении в среде активного радикала X•, которым может быть липидный радикал, т.е. радикал ПНЖК, такой как алкил L•, алкоксил LO• или пероксил LOO•, другие органические радикалы и радикал гидроксила HO•:



Продукты цепного окисления, гидропероксиды липидов LOOH, могут стать источником новых радикалов, а следовательно – источником новых цепей окисления, при реакции одноэлектронного восстановления, например, в присутствии ионов Fe<sup>2+</sup>, либо при пероксидазной реакции, катализируемой гемо-

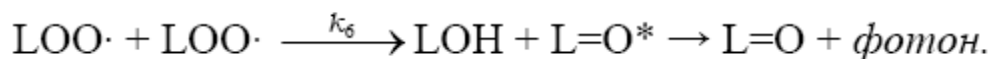


выми белками, в том числе цитохромом *c*, связанным с кислыми фосфолипидами на поверхности внутренней мембраны митохондрий:

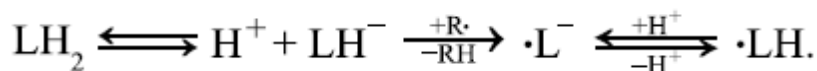


При этом происходит разветвление цепи окисления и скорость ПОЛ в системе резко возрастает.

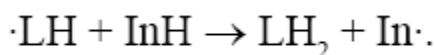
В этих реакциях возбужденные молекулы образуются при взаимодействии двух пероксидных радикалов. В специальных опытах с растворами, не содержащими кислорода, было показано, что образование одних только радикалов  $\text{L}\cdot$  и  $\text{LO}\cdot$  недостаточно для возникновения ХЛ, нужны радикалы  $\text{LOO}\cdot$ , которые образуются в присутствии кислорода. Наиболее вероятно, что ХЛ при липопероксидации связана с диспропорционированием радикалов  $\text{LOO}\cdot$ :



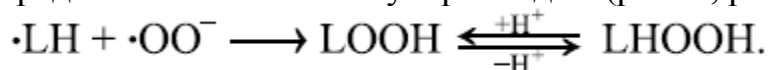
Рассмотрим механизм реакций ответственных за свечение люминола. В упрощенном виде процесс протекает в три этапа. Первая стадия – это окисление люминола каким-либо сильным оксидантом, например, радикалом или окисленной формой металла переменной валентности (рис. 6, реакции 1 и 2):



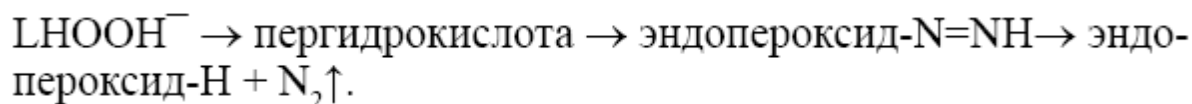
Образовавшийся оксильный радикал люминола может вступать в различные реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем  $\text{R}\cdot$ , подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта  $\text{InH}$ :



Второй и весьма важный этап в развитии ХЛ-реакции – появление ключевого гидропероксидного продукта (4-гидроперокси-1-окси-5-аминофталазин-4-олата), которое в биохимических системах обычно происходит при взаимодействии радикала люминола с супероксидом (рис. 6, реакция 3):



Собственно ХЛ-реакция начинается с превращения гидропероксида ( $\text{LOOH}$ ) в соединение, содержащее эндопероксидную химическую группу (2,3-перокси-ди[гидрокси-метиленил]фениламин) (реакции 4 – 6 на рис. 6):



На заключительном этапе в эндопероксидной группе разрывается связь между атомами кислорода и образуется молекула монопротонированной аминфталевой кислоты в электронно-возбужденном состоянии с последующим испусканием кванта света (реакции 7 и 8 на рис. 6).

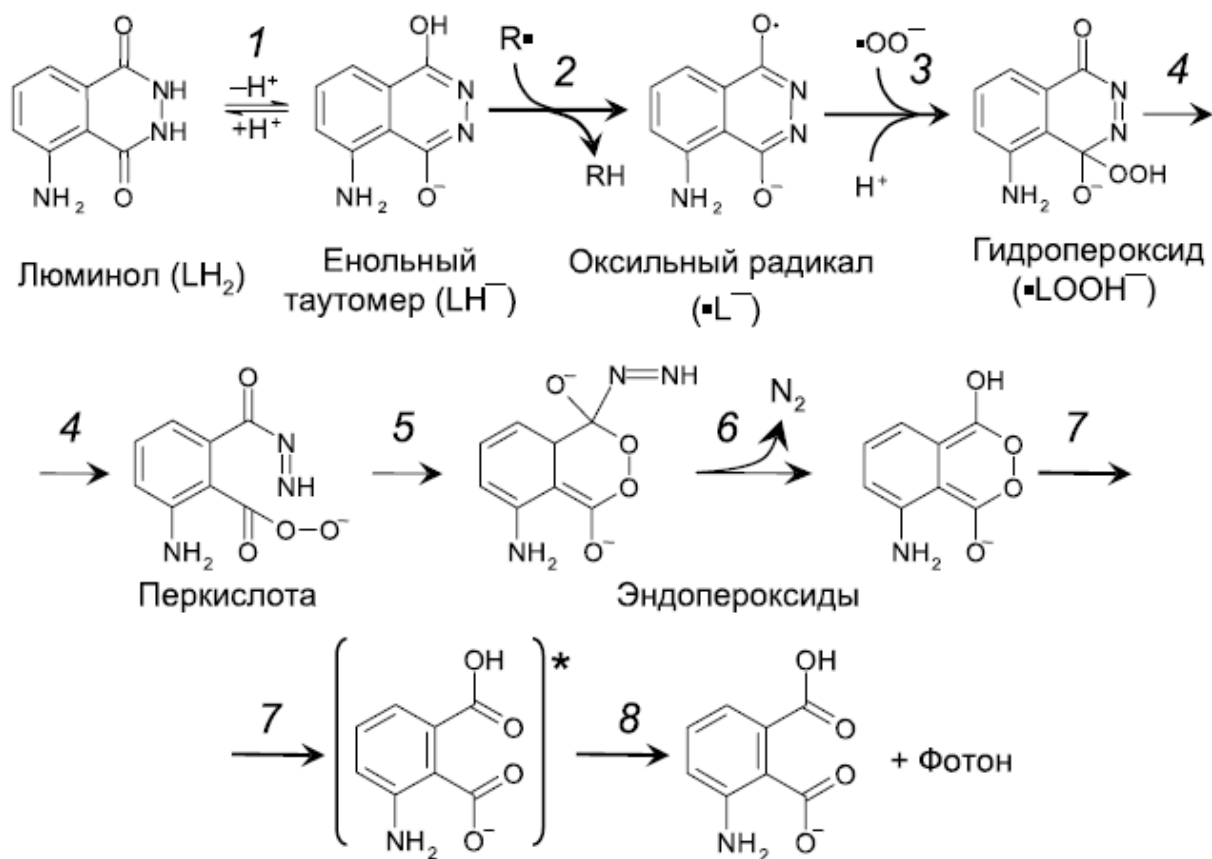


Рис. 6. Одноэлектронное окисление люминола

### 3.2. Экспериментальная часть

**Приборы и материалы:** хемилуминометр Synergy 2 (Biotek), 12-ти луночный планшет, дозаторы, корни растений, раствор люминола в 0,5 М NaOH, 3%-ный раствор пероксида водорода, весы.

#### Регистрация хемилуминесценции

1. Включить прибор тумблерами на передней панели и блоке питания.
2. Запустить программу «Gen5 2.00» с ярлыка на рабочем столе компьютера.
3. В окне «Task Manager» в разделе «Experiments» выбрать «Create New Protocol».



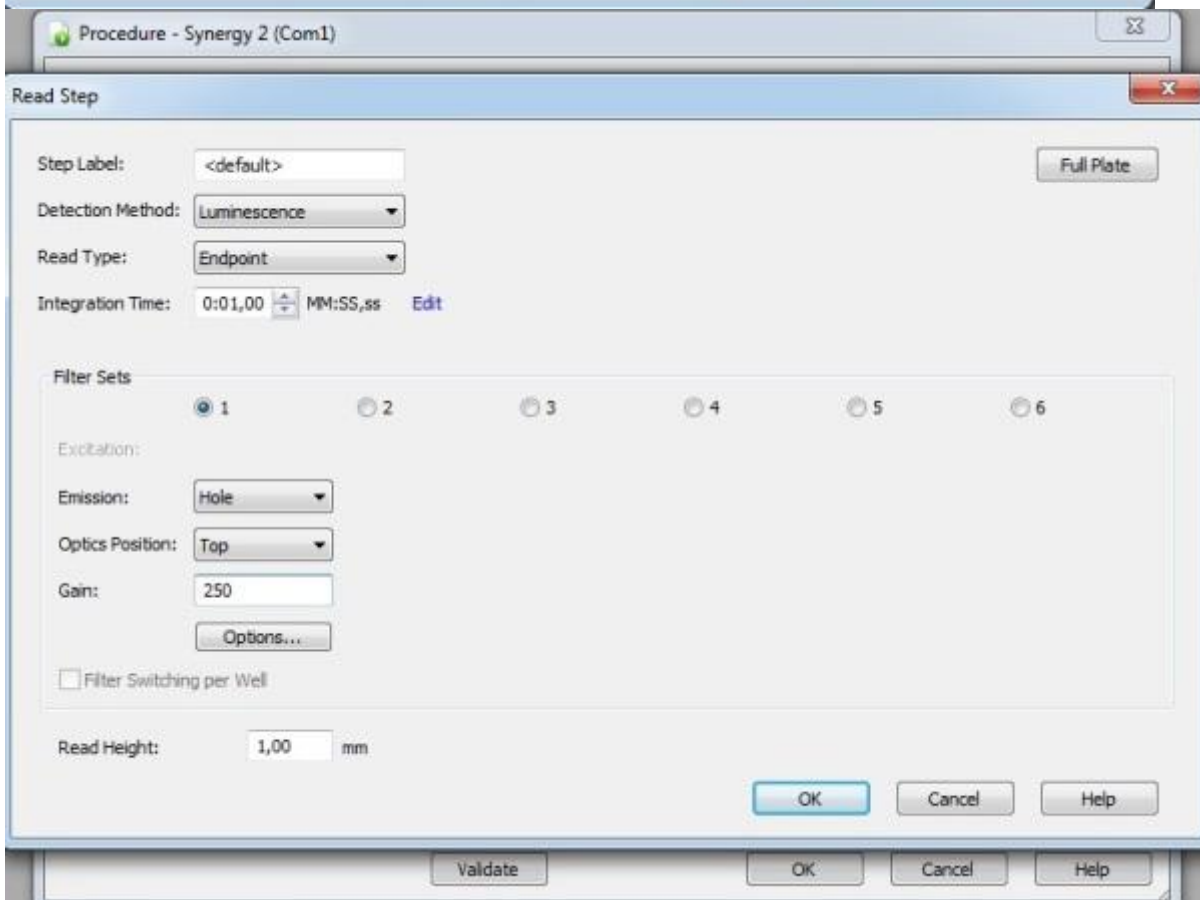
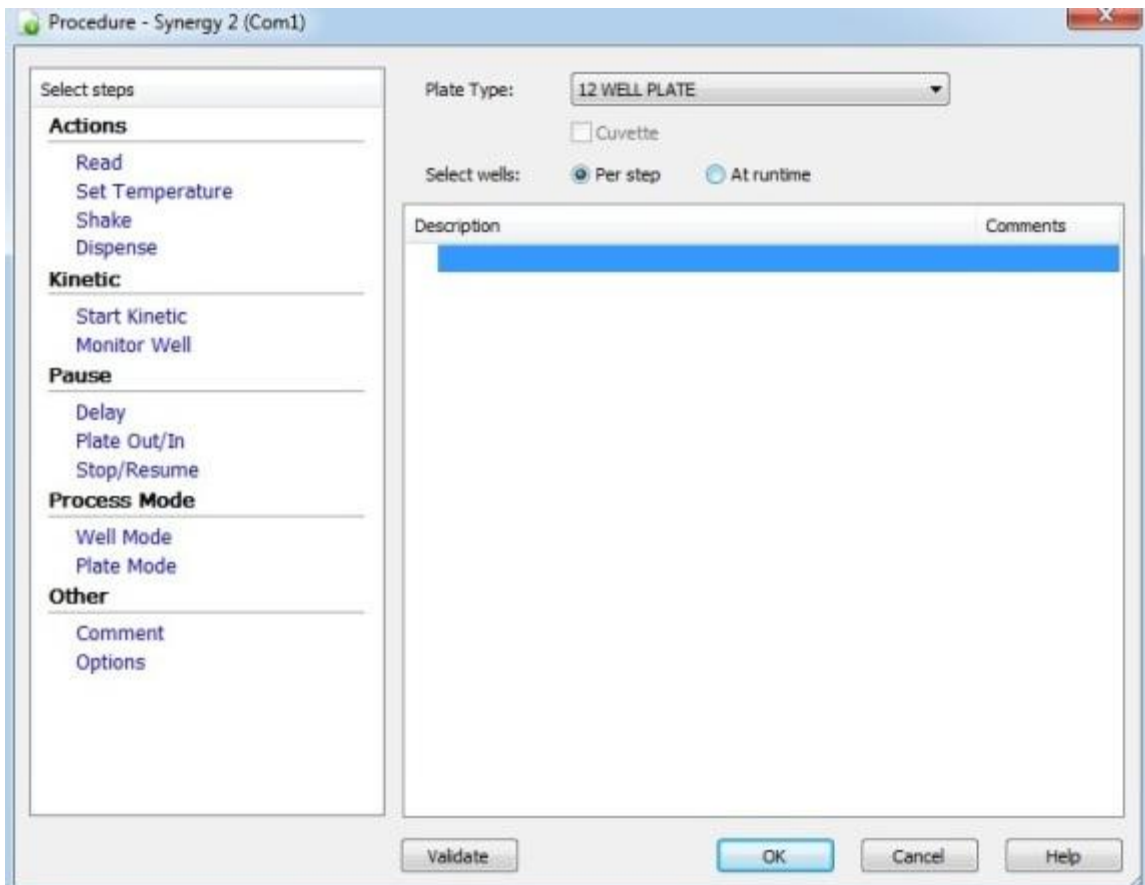
4. В меню «Protocol» выбрать раздел «Procedure», в окне «Procedure - Sinergy2 (Com1)» в всплывающем меню «Plate Type» выбрать тип планшета: «12 Well Plate».

5. Выбрать в левом меню окна «Procedure - Sinergy2 (Com1)» раздел «Read».

6. В окне «Read Step» кликнуть по кнопке «Full Plate» и выбрать одну или несколько ячеек планшета, где будут производиться измерения.

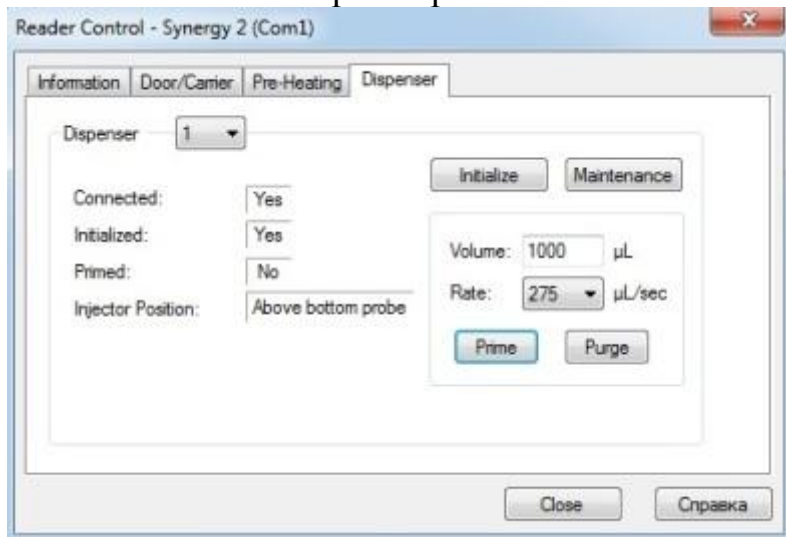
7. В поле «Detection Method» выбрать «Luminescence», в поле «Gain» (усиление) вбить число 250, остальные позиции оставляем по умолчанию, нажать кнопку «ОК».

8. Измерение запускаем нажатием кнопки «Read New» на панели инструментов.



## Добавление веществ через диспенсер в исследуемый раствор и снятие кинетики хемилюминесценции.

1. Выбираем в меню «System» раздел «Reader Control» далее «Sinergy 2 (Com 1)», переходим на вкладку «Dispenser», выбираем номер диспенсера, в поле «Volume» выставляем число 1000 (минимальный рекомендованный объем). Установить в держатель специальный планшет для праймирования, трубку соответствующего диспенсера погрузить в емкость с раствором, нажать кнопку «Prime». По окончании праймирования нажать кнопку «Close».



2. В меню «Protocol» выбрать раздел «Procedure», в окне «Procedure - Sinergy2 (Com1)» в всплывающем меню «Plate Type» выбрать тип планшета: «12 Well Plate».

3. В левом меню окна «Procedure - Sinergy2 (Com1)» выбираем опцию «Dispense», в окне «Dispense Step» выбираем номер диспенсера, ячейку планшета и объем добавляемого раствора, нажимаем кнопку «OK».

4. Выбираем опцию «Start Kinetic», в окне «Kinetic Step» в поле «Run Time» задаем время измерения, в поле «Interval» временной интервал между двумя точками.

5. Выбираем опцию «Read», в окне «Read Step» задаем параметры измерения хемилюминесценции как это описано ранее, номера ячеек планшета, указанные в пп. 3 и 5 должны совпадать.



6. Измерение запускаем нажатием кнопки «Read New» на панели инструментов.

### 3.3. Задания к лабораторной работе

#### **Задание 1. Исследовать зависимость хемилюминесценции люминола от концентрации пероксида водорода**

1. Снять кинетику хемилюминесценции непосредственно после добавления люминола к растворам пероксида водорода различной концентрации (0,3%, 0,03%, 0,003%).

2. Построить график зависимости площади под кривой хемилюминесценции люминола от концентрации пероксида водорода.

3. Определить концентрацию раствора пероксида водорода неизвестной концентрации.

#### **Задание 2. Исследовать собственную хемилюминесценцию корней растения и хемилюминесценцию активированную люминолом**

1. Измерить интенсивность собственной хемилюминесценции корней растения, а так же хемилюминесценции, активированной люминолом в разных концентрациях ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М).

2. Построить график зависимости интенсивности хемилюминесценции от концентрации люминола.

## Рекомендованная литература

1. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высш. шк., 1989. 199 с.
2. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341-388.
3. Конев С.В., Вологовский И.Д. Фотобиология. Минск, Изд-во БГУ, 1979. 384 с.
4. Современные методы биофизических исследований: Практикум по биофизике. Под ред. А. Б. Рубина. М.: Высш. шк, 1988. 359 с.

**ФОТОБИОЛОГИЯ. РАЗДЕЛ БОЛЬШОГО ПРАКТИКУМА  
ПО БИОФИЗИКЕ. ЧАСТЬ 1**

**Мысягин С.А., Сурова Л.М., Шерстнева О.Н., Воденеев В.А.**

*Учебно-методическое пособие*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования «Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского».  
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.  
Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .  
Заказ № . Тираж экз.  
Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета  
им. Н.И. Лобачевского  
603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37  
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01