

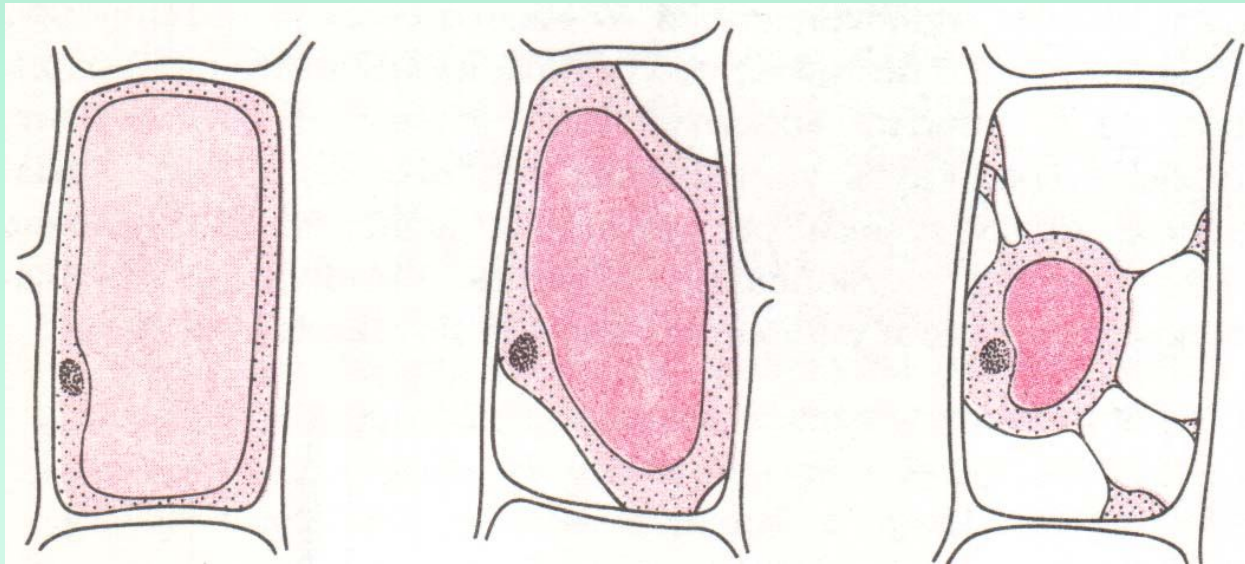
**ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ  
МЕМБРАН**

**МОДЕЛИ МЕМБРАН**

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ  
МЕМБРАН**

1851 **Гуго МОЛЬ** (1805—1872)

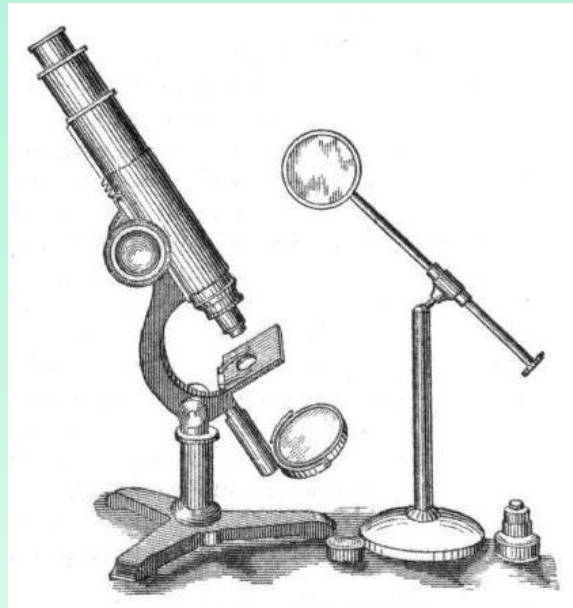
ОПИСАЛ ПЛАЗМОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ  
КЛЕТОК, ПРЕДПОЛОЖИЛ, ЧТО КЛЕТКИ  
ОКРУЖЕНЫ **МЕМБРАНОЙ**



1855 **К. НАГЕЛИ:** КЛЕТОЧНАЯ  
ПОВЕРХНОСТЬ – БАРЬЕР ДЛЯ  
ПРОНИКНОВЕНИЯ КРАСИТЕЛЯ В  
КЛЕТКУ



Микроскопы XVIII века



Микроскоп, 1876 год

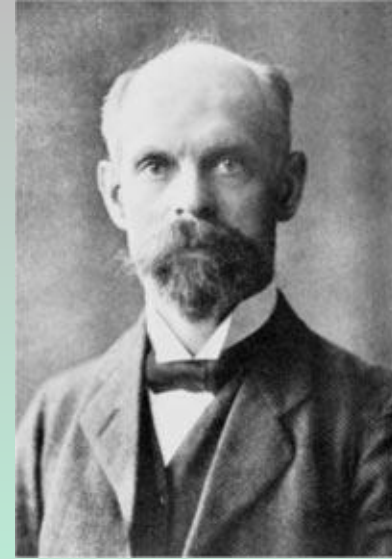


Современный  
микроскоп



**Клеточная стенка**

# ЭКСПЕРИМЕНТЫ ОВЕРТОНА



Чарльз Эрнст Овертон  
(1865–1933)



**Э.Овертон** (1895 г.):  
клеточная мембрана  
избирательно проницаема, т.  
к. через нее в клетки легко  
проникают жирорастворимые  
вещества.

Предположение: в состав  
мембран входят липиды.

# МОНОСЛОЙ ЛИПИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ВОДЫ

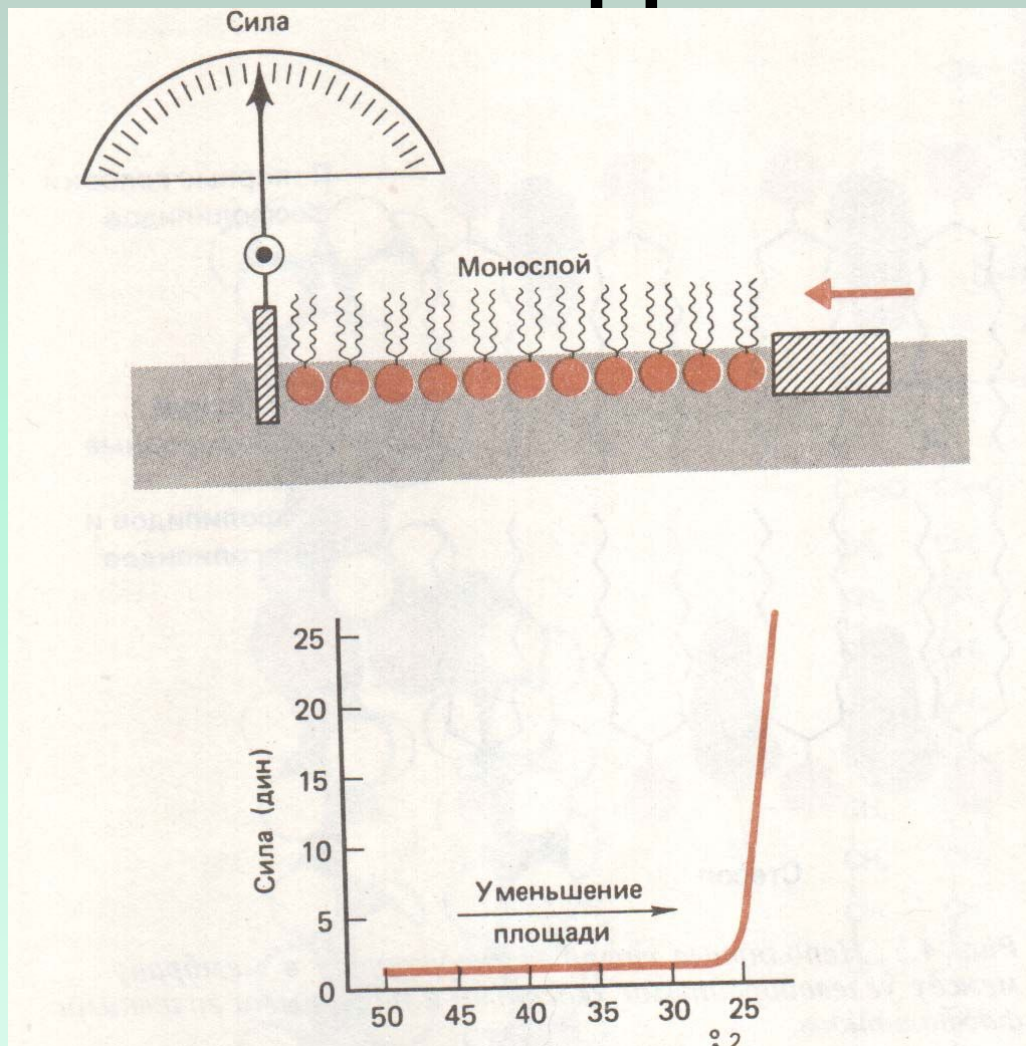


ХВОСТЫ В  
ВОЗДУХЕ

ГОЛОВКИ В  
ВОДЕ

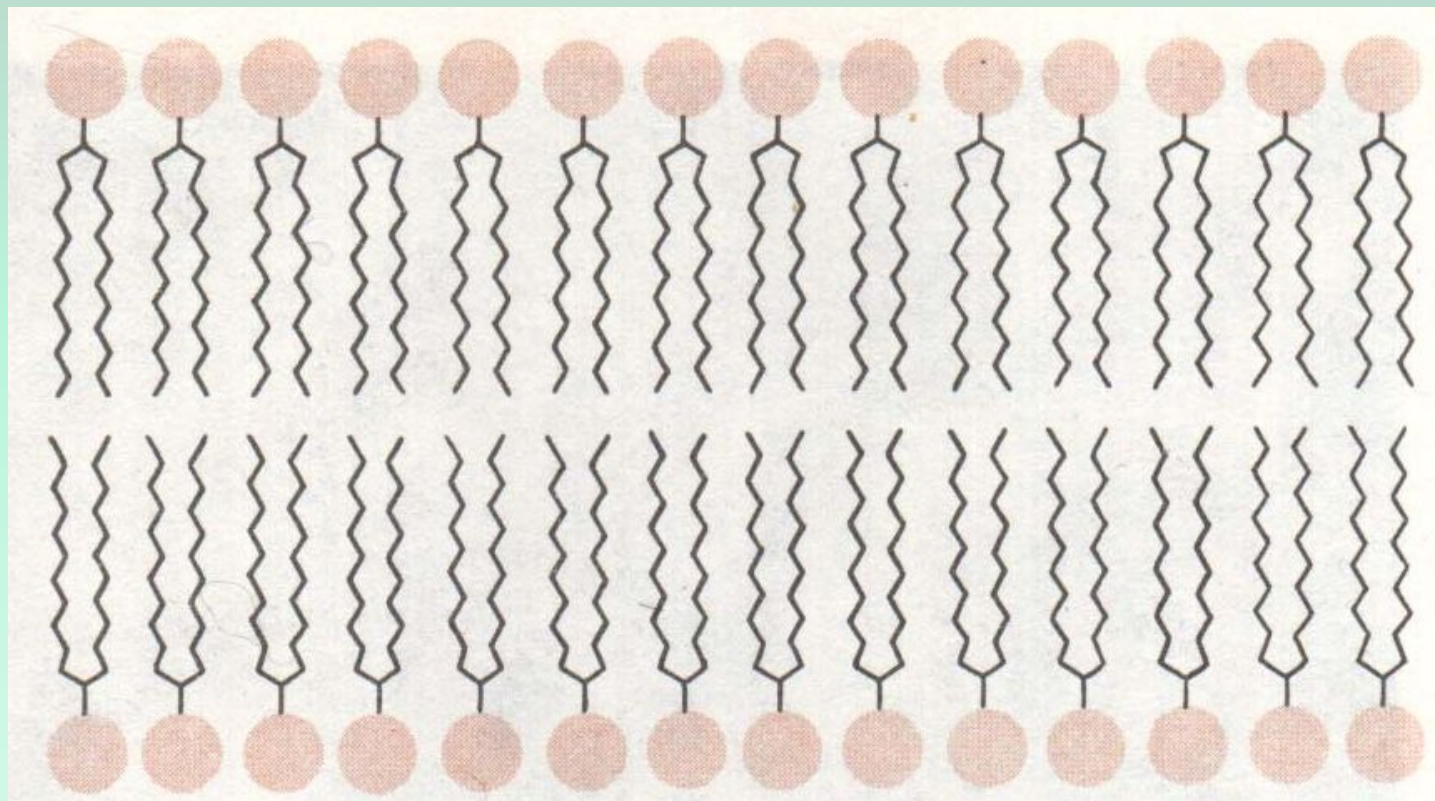
**Э.ГОРТЕР и Ф.ГРЕНДЕЛ** ЭКСТРАГИРОВАЛИ  
ЛИПИДЫ ИЗ МЕМБРАН ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ И  
НАНОСИЛИ НА ПОВЕРХНОСТЬ ВОДЫ

# ЭКСПЕРИМЕНТ Э.ГОРТЕРА И Ф. ГРЕНДЕЛА





# БИСЛОЙ ГОРТЕРА - ГРЕНДЕЛА



# ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП

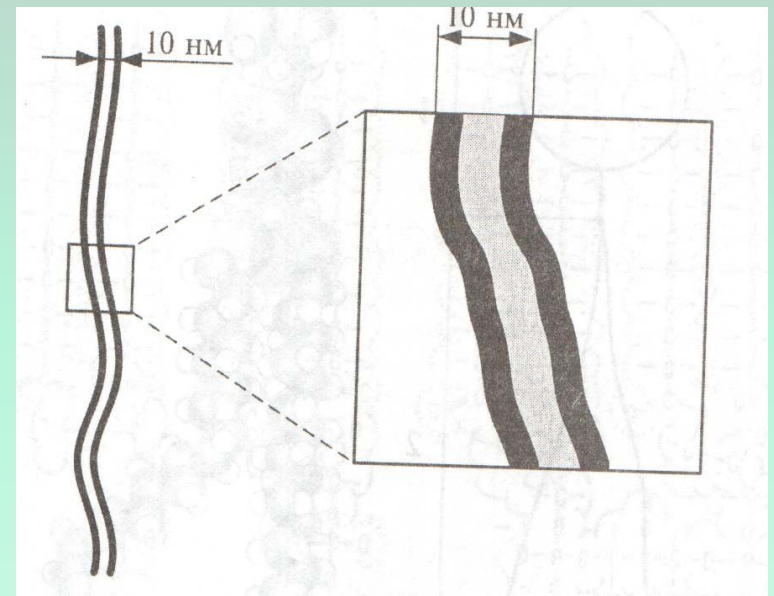


ЭЛЕКТРОНЫ  
УСКОРЯЮТСЯ  
ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ  
ПОЛЕМ

НАПРЯЖЕНИЕМ  $10^5$  В,  
ИХ СКОРОСТЬ  $10^6$  М/С,

ДЛИНА ВОЛНЫ 0,1 НМ

# ТРЕХСЛОЙНОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ БИОМЕМБРАНЫ НА ЭЛЕКТРОНОГРАММЕ

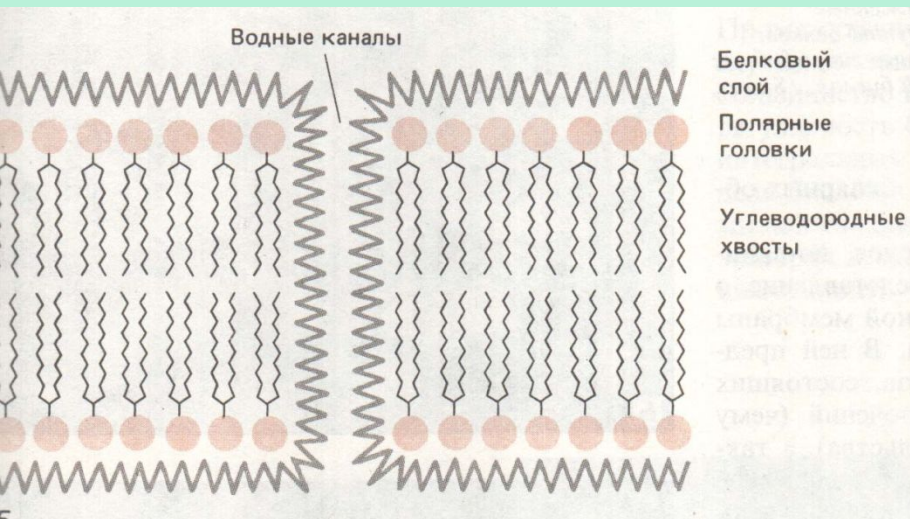


**МЕЖДУ ПАРОЙ ТЕМНЫХ  
ПОЛОС – СВЕТЛОЕ  
ПРОСТРАНСТВО**

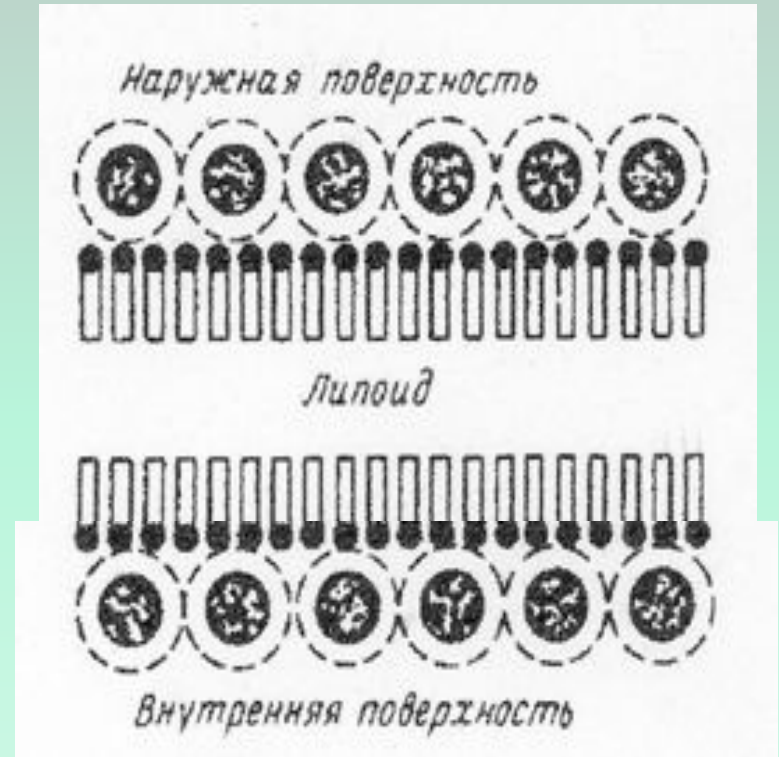
# МОДЕЛИ МЕМБРАНЫ



Джеймс Дэвид Робертсон  
(1923 - 1995)



Унитарная модель  
мембраны Робертсона

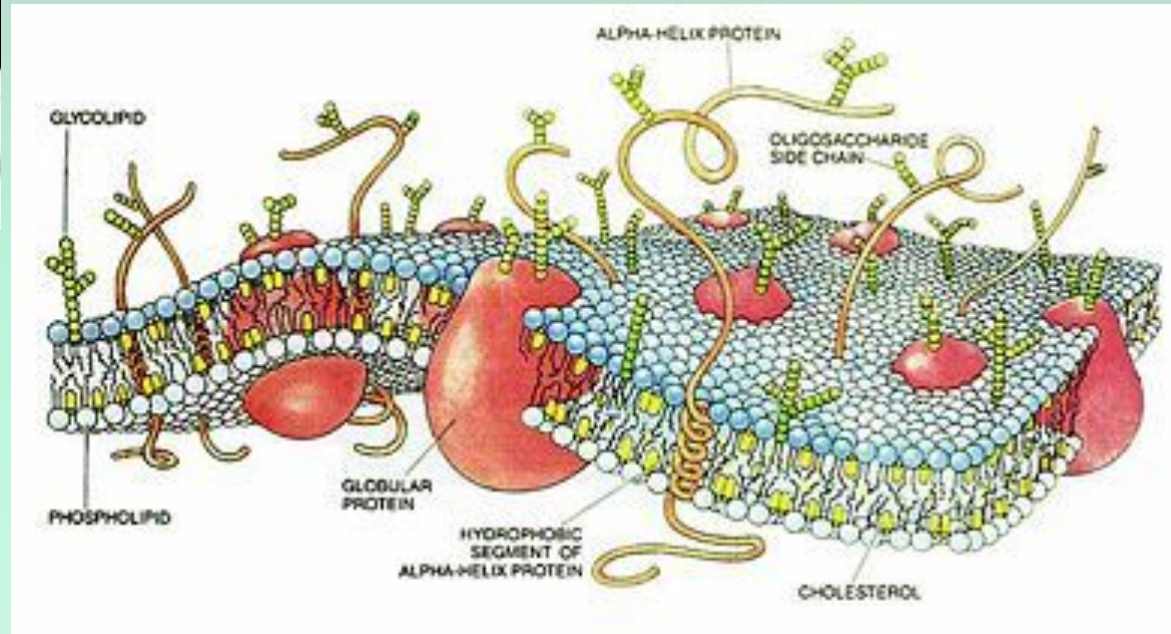


Модель Даниэлли -  
Давсона

# МЕТОД ЗАМОРАЖИВАНИЯ - СКАЛЫВАНИЯ

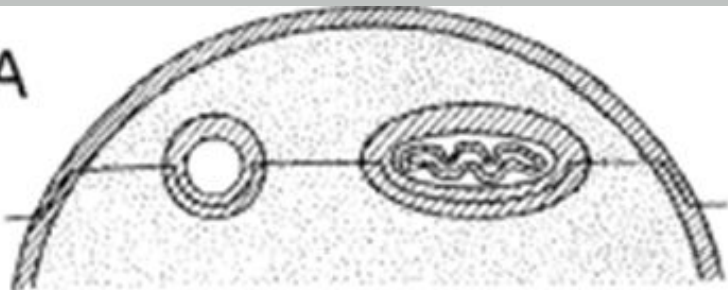


**Николсон и Сингер**



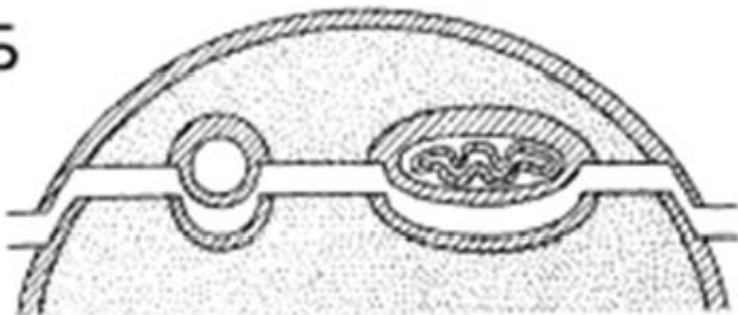
**СХЕМА ЖИДКОСТНО-МОЗАИЧНОЙ МОДЕЛИ  
МЕМБРАНЫ С.СИНГЕРА И Г.НИКОЛСОНА  
(1972 г.)**

А



А скалывание образца

Б



Б разделение двух половинок

В



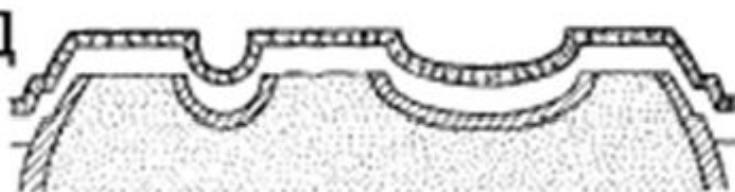
В возгонка льда (травление)

Г



Г напыление парами металла

Д

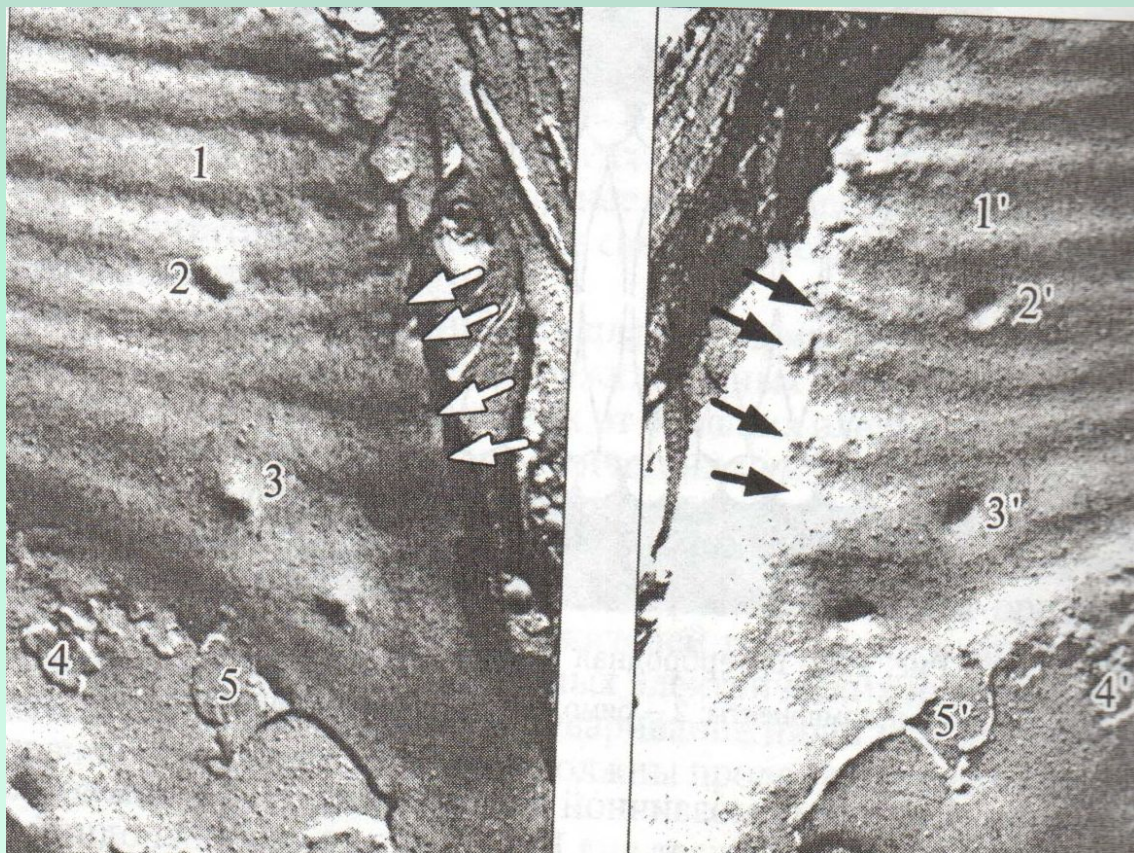


Д отведение реплики от образца с помощью флотации



**МИКРОФОТОГРАФИЯ  
МЕМБРАНЫ,  
ПРИГОТОВЛЕННОЙ  
МЕТОДОМ  
ЗАМОРАЖИВАНИЯ –  
СКАЛЫВАНИЯ**

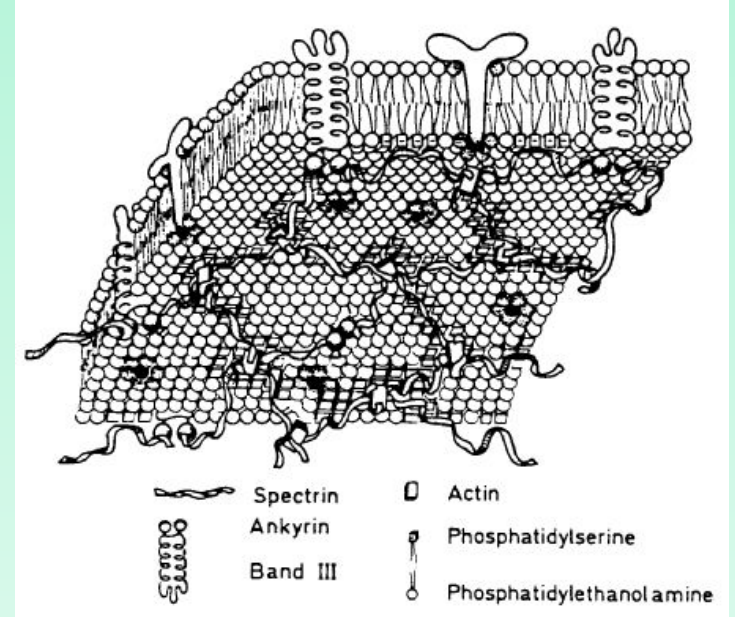
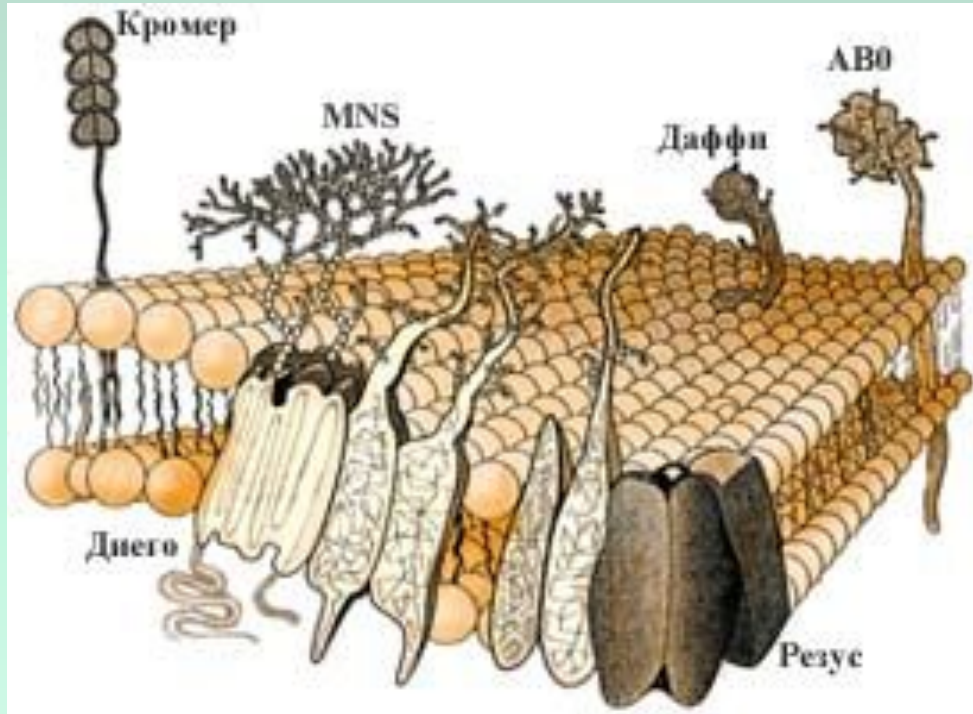
# ЭЛЕКТРОНОГРАММА ПОВЕРХНОСТЕЙ СКОЛА БИОМЕМБРАНЫ (МЕТОД ЗАМОРАЖИВАНИЯ - СКАЛЫВАНИЯ)



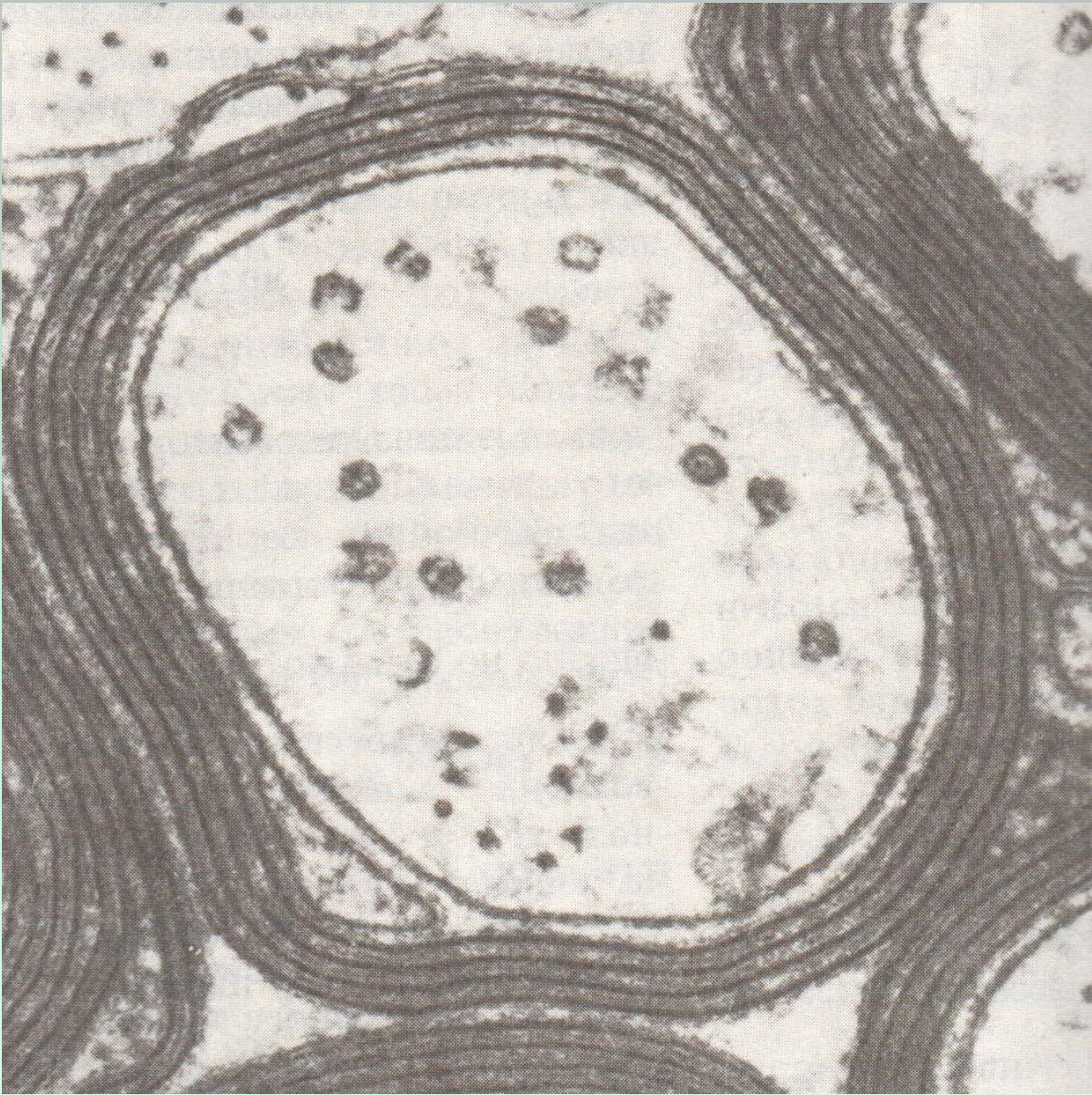
**ВЫСТУПАМ (1-5) НА ЛЕВОЙ ПОВЕРХНОСТИ СООТВЕТСТВУЮТ ВМЯТИНЫ (1\* - 5\*)**



# МОДЕЛЬ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА

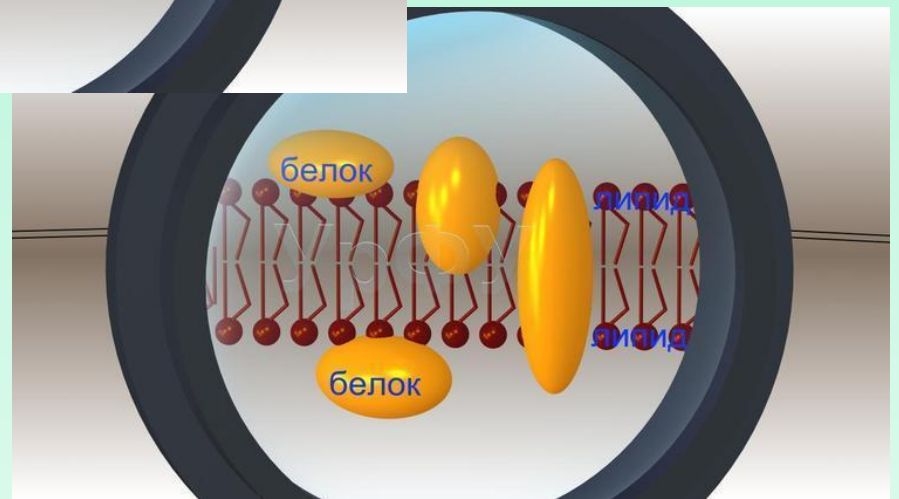
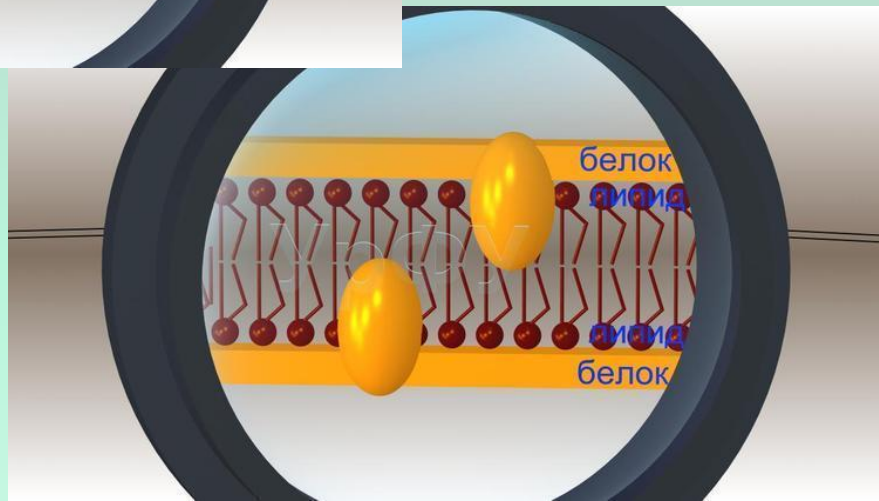
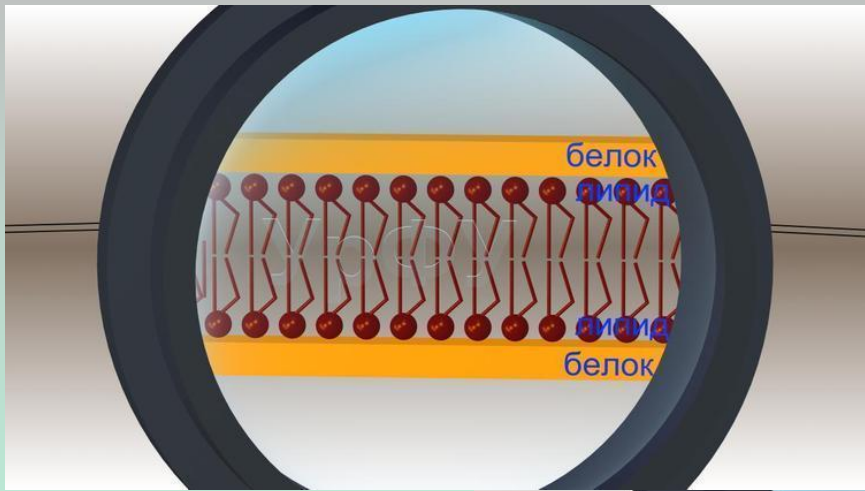


**МИЕЛИНОВАЯ  
ОБОЛОЧКА**

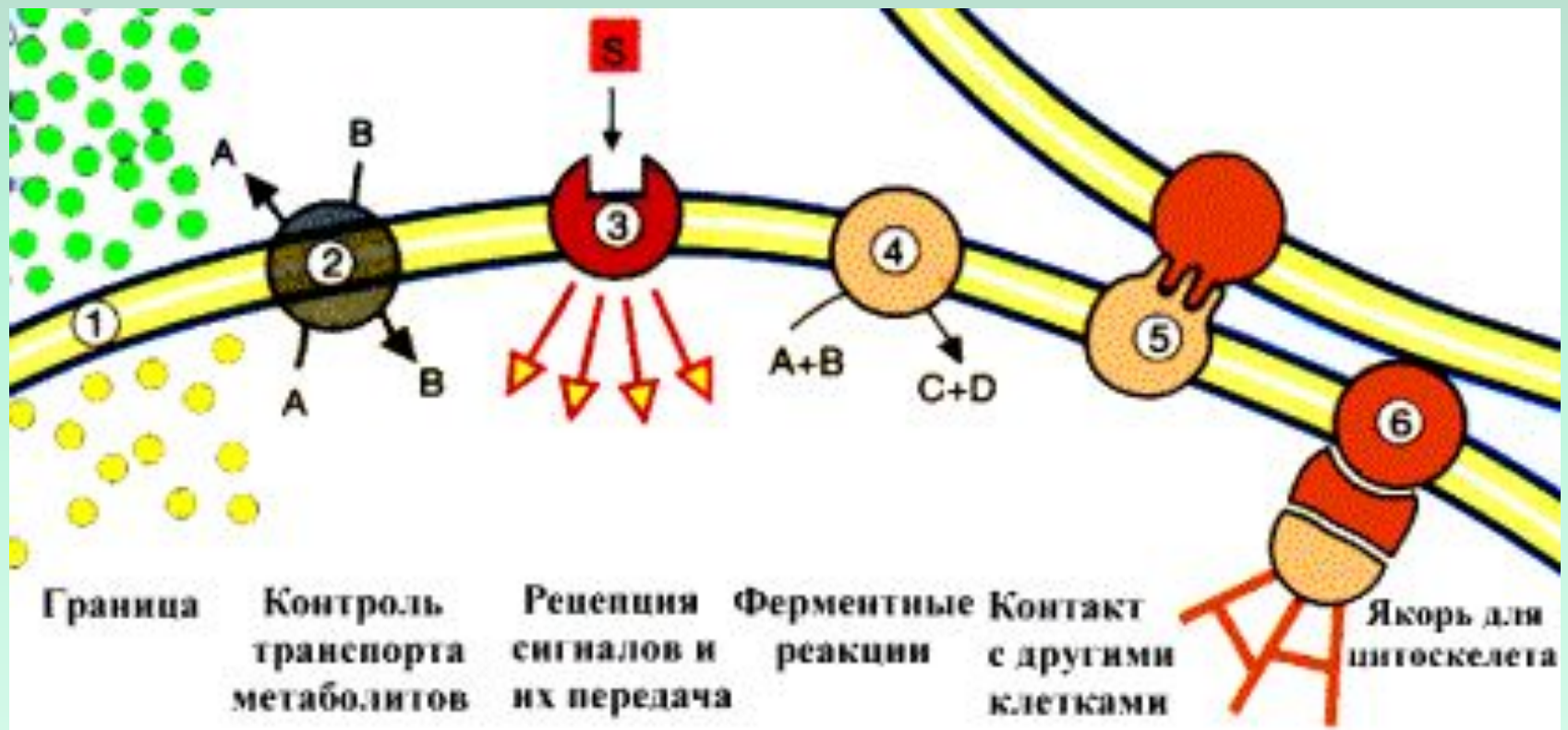


# ЭТАПЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕМБРАН

Дата	Фамилии учёных	Суть открытия
Кон. XIX в.	Овертон	Заметил, что жиры проникают в клетки быстрее, чем другие вещества. <b>Предположил, что мембраны состоят из липидов.</b>
<i>Сколько слоёв липидов входят в состав мембраны?</i>		
1925 г.	Гортер и Грендел	Эксперимент с мембранами эритроцитов. <b>Предположили, что липиды в мембране образуют бислой.</b>
<p>Было обнаружено, что кроме липидов в состав мембран входят ещё и белки. <i>Как расположены относительно друг друга белки и липидный бислой?</i></p>		
1935 г.	Дэвисон и Даниэлли	«Модель сэндвича». <b>Предположили, что липидный бислой находится между двумя слоями белка.</b>
1959 г.	Робертсон	Выдвинул гипотезу о строении элементарной мембраны, подтвердив гипотезу Дэвисона и Даниэлли о трёхслойности мембраны.
<i>Накапливались новые данные о строении мембраны. Был изобретён метод замораживания-скалывания.</i>		
1972 г.	Сингер и Николсон	Жидкостно-мозаичная модель мембраны. <b>Белковые молекулы, плавающие в жидком липидном бислое, образуют в нём как бы мозаику.</b>

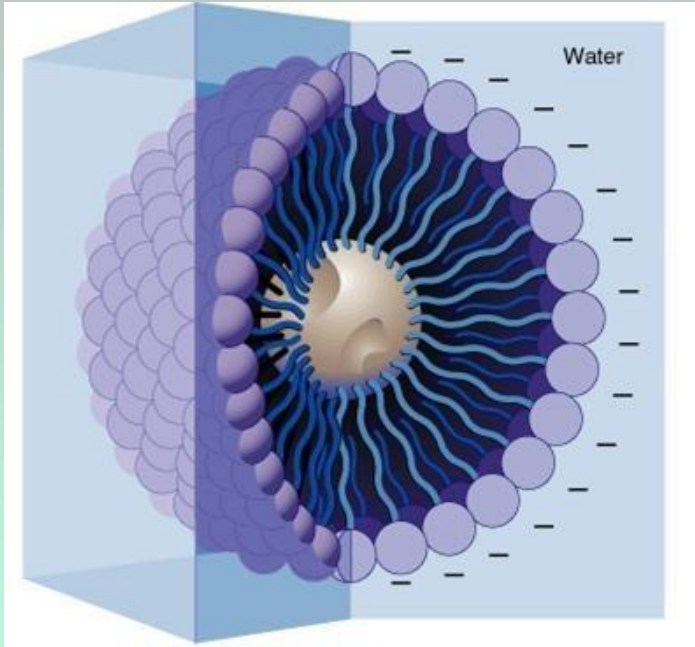


# ФУНКЦИИ МЕМБРАН



# ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ

# ИСКУССТВЕННЫЕ МЕМБРАНЫ - ЛИПОСОМЫ



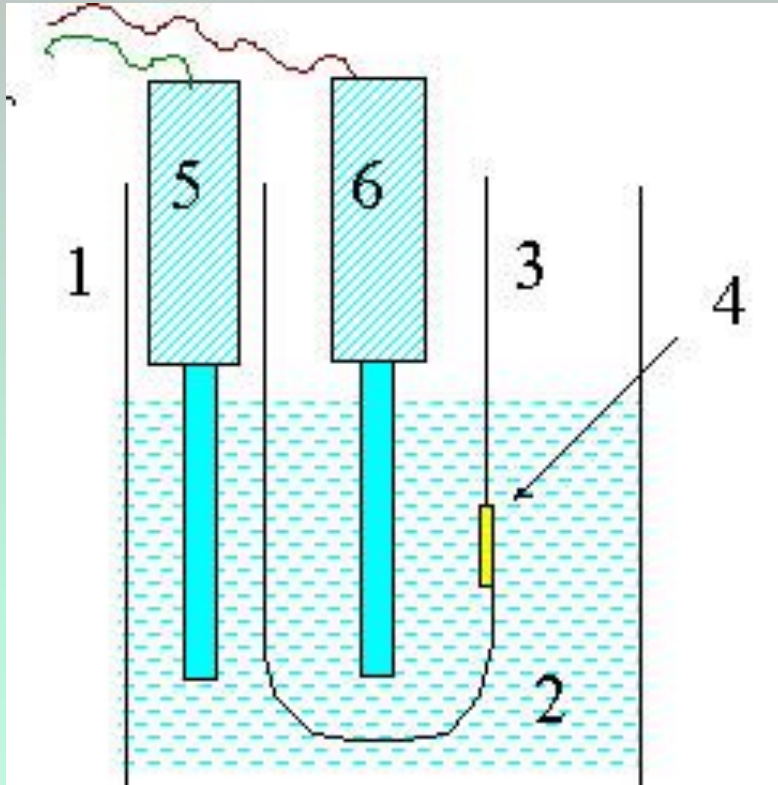
Однослойные  
ЛИПОСОМЫ



бислойная липосома



многослойная липосома



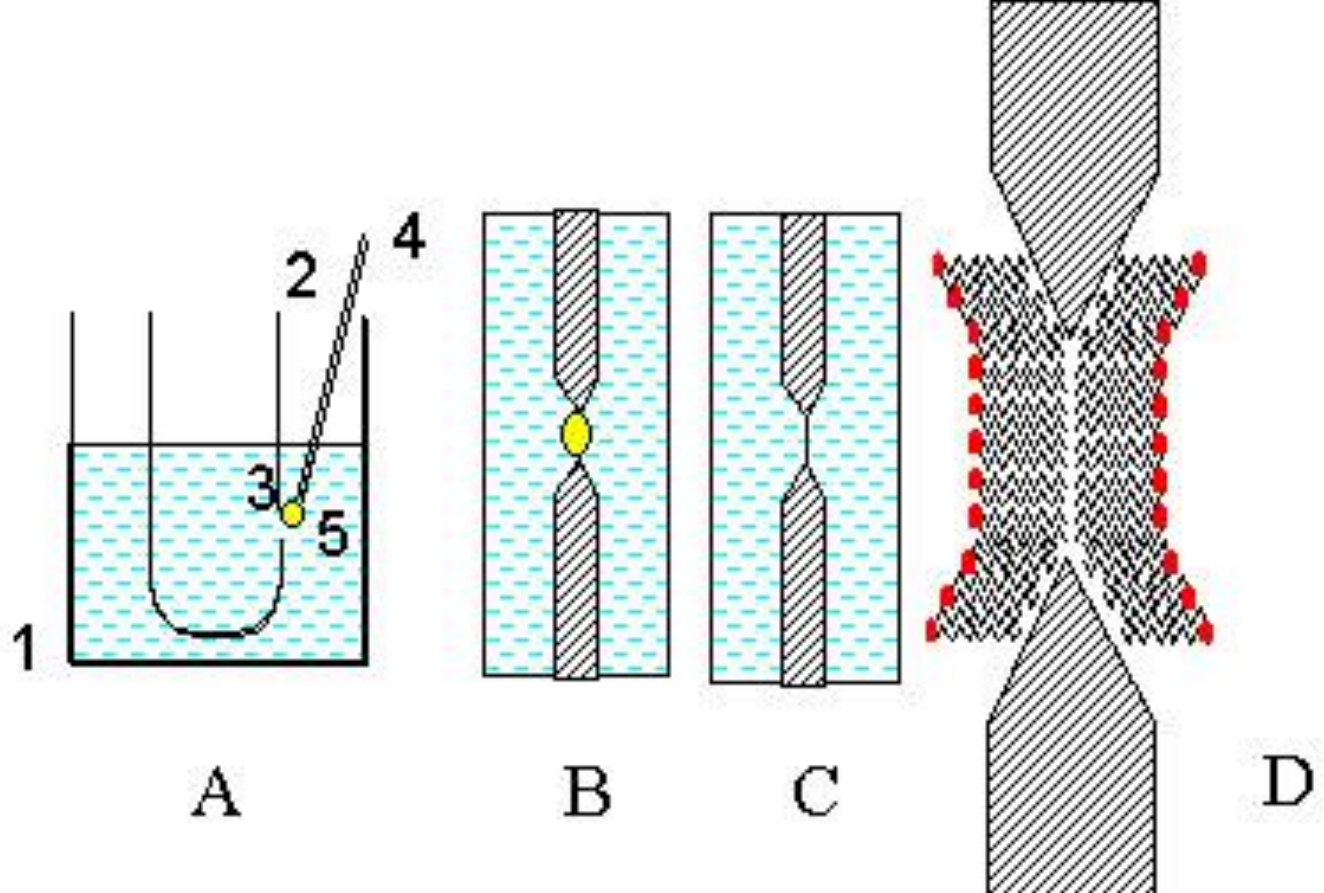
## Приготовление бимолекулярных липидных мембран (БЛМ)

1 -стеклянный стакан

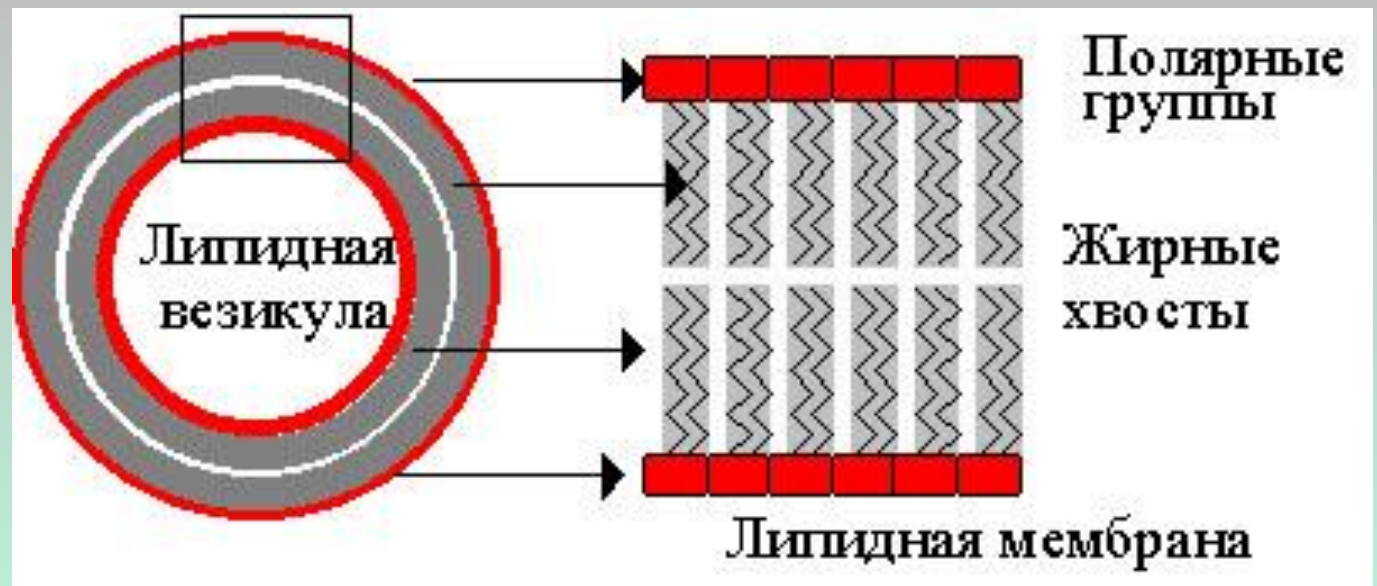
2 - раствор электролита

3 - тефлоновый сосуд с отверстием в стенке (4).



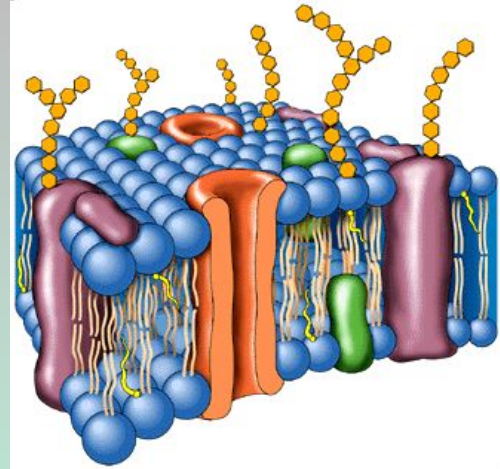


- А - вносим с помощью капилляра (4) каплю раствора фосфолипида в гептане (5) в отверстие в стенке сосуда (3).  
 В - капля закрывает просвет отверстия.  
 С - постепенно растворитель уходит и образуется БЛМ  
 D - БЛМ при очень большом увеличении

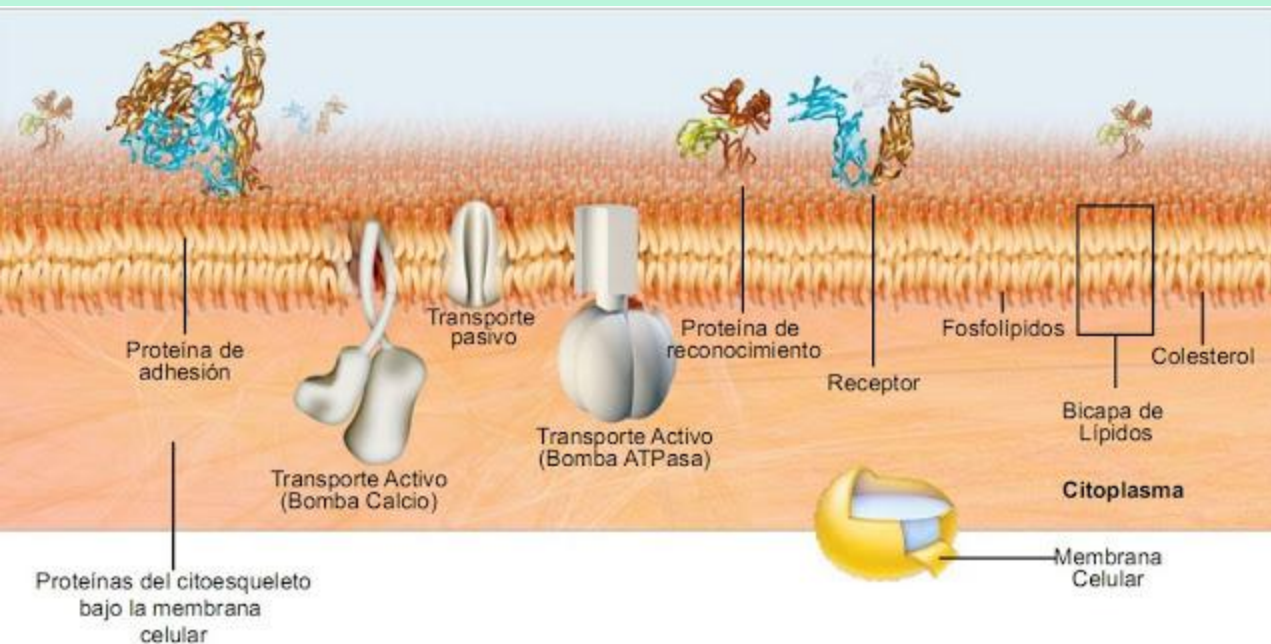


## Самосборка фосфолипидных везикул в водном растворе





# МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАН



# МЕТОДЫ

- ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН
- ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ
- ЭКСТРАКЦИЯ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ МЕМБРАН
- РАЗДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ НА КЛАССЫ
- ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ
- РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ
- ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ БИОФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ  
(ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ЭПР, ЯМР, ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И ДР.)

# МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН

НЕДЕСТРУКТИВНЫЕ



ПОЛУЧЕНИЕ ВЕЗИКУЛ,  
ОТДЕЛЯЮЩИХСЯ ОТ  
ПОВЕРХНОСТИ  
КЛЕТОК

ДЕСТРУКТИВНЫЕ

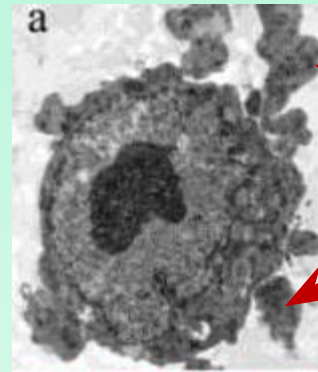
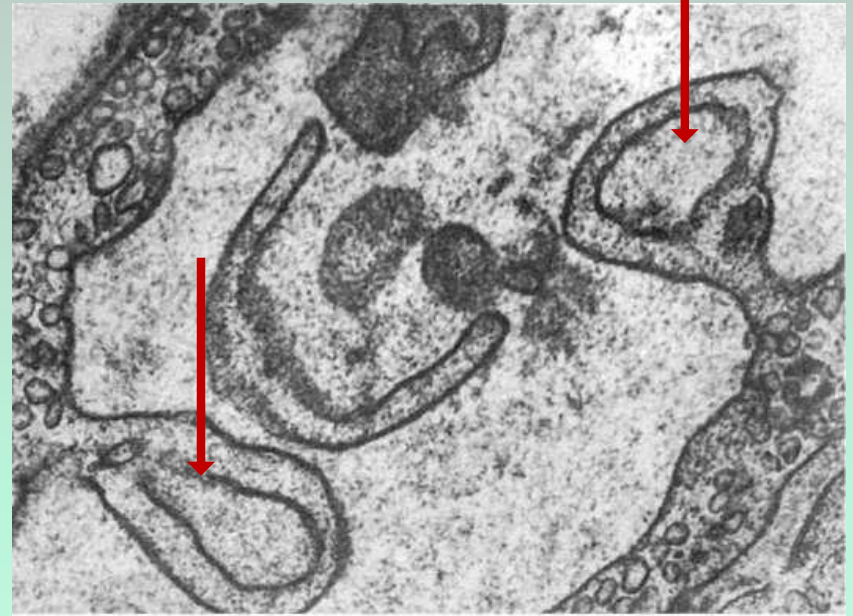


ОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК  
КЛЕТОК  
ГОМОГЕНИЗАЦИЯ  
ТКАНЕЙ

# НЕДЕСТРУКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН

ИНКУБАЦИЯ КЛЕТОК В  
СРЕДАХ  
ОПРЕДЕЛЕННОГО СОСТАВА  
ПРИВОДИТ К  
СПОНТАННОМУ  
ОТДЕЛЕНИЮ ОТ ИХ  
ПОВЕРХНОСТИ **ВЕЗИКУЛ**

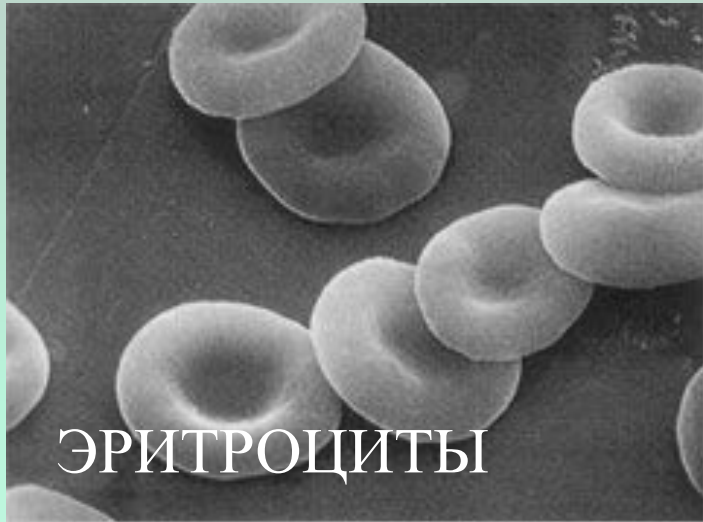
ВЕЗИКУЛЫ ЗАТЕМ  
ОТДЕЛЯЮТСЯ ОТ  
КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ  
ПУТЕМ  
ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ ПРИ  
НИЗКИХ СКОРОСТЯХ (500 g)



отделение пузырьков  
от поверхности клетки  
без повреждения  
мембраны (клетки)  
HeLa

Пузырьки  
(везикулы)

# ДЕСТРУКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН



ГИПООСМОТИЧЕСКИЙ  
ШОК (ДЛЯ ЭРИТРОЦИТОВ)

ПОЛУЧЕНИЕ ТЕНЕЙ  
ЭРИТРОЦИТОВ

# ДЕСТРУКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕМБРАН



ГОМОГЕНИЗАЦИЯ ТКАНЕЙ

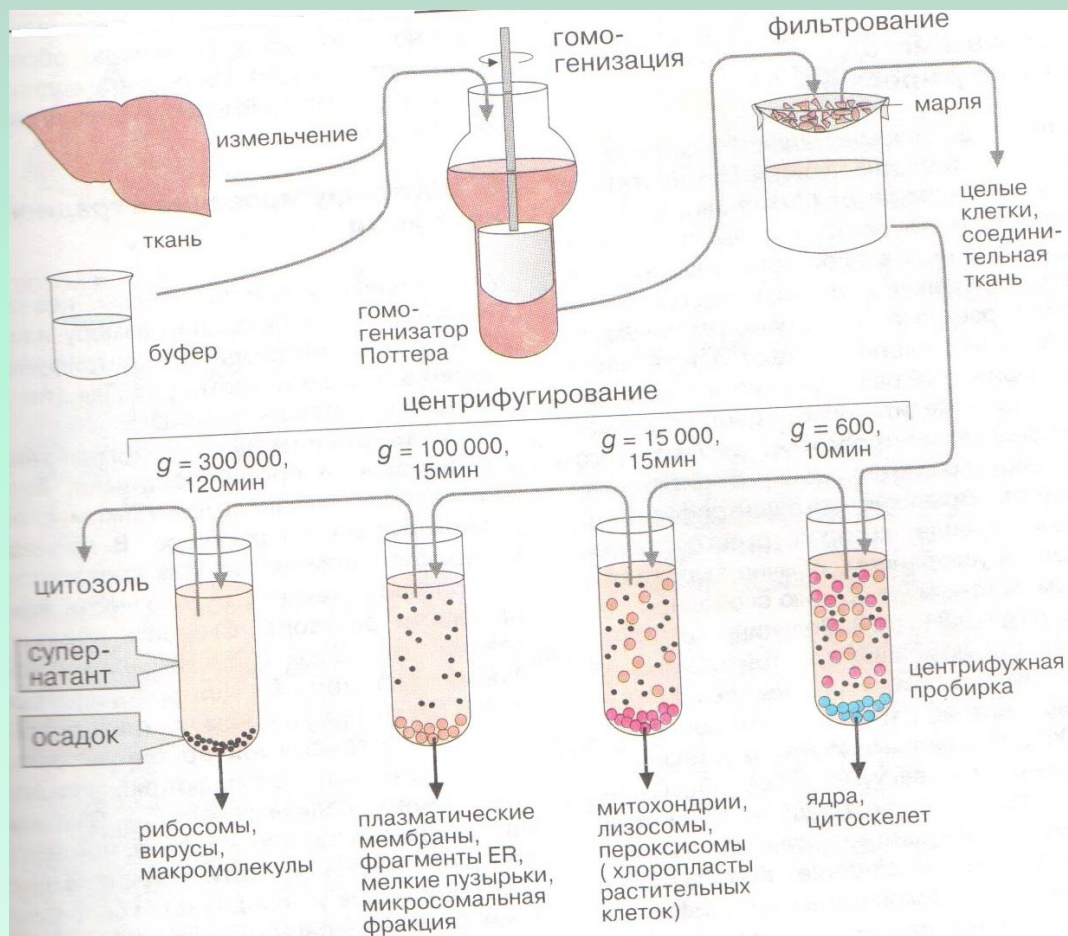
РАЗДЕЛЕНИЕ МЕМБРАН НА ФРАКЦИИ ПУТЕМ  
ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ В ГРАДИЕНТЕ  
ПЛОТНОСТИ (при постоянном центробежном  
ускорении)



Фракционирование клеточных компонентов с помощью центрифуги. Развиваемые центрифугой центробежные ускорения измеряются числом  $g$  ( $g$  — ускорение силы тяжести).

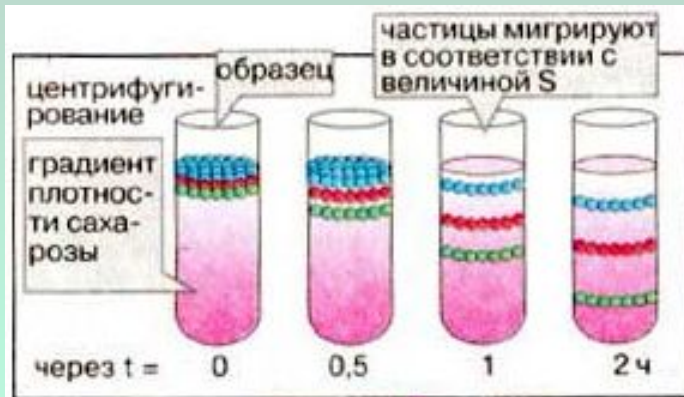


# ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ИСПОЛЬЗУЮТ МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ (при различном центробежном ускорении )



Центробежное ускорение выражают величиной, которая кратна ускорению свободного падения  $g=9,81 \text{ м/с}^2$

# ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ



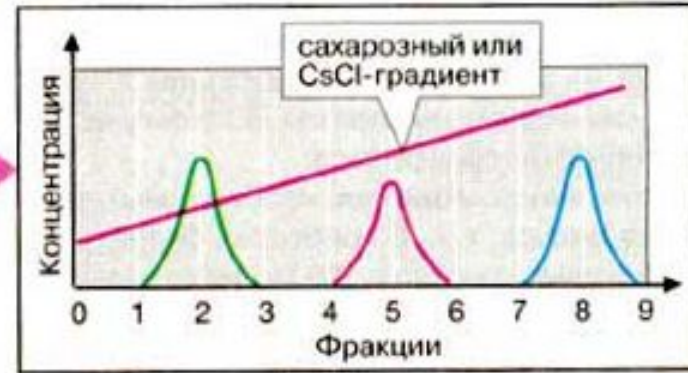
Зональное центрифугирование



Изопикническое центрифугирование

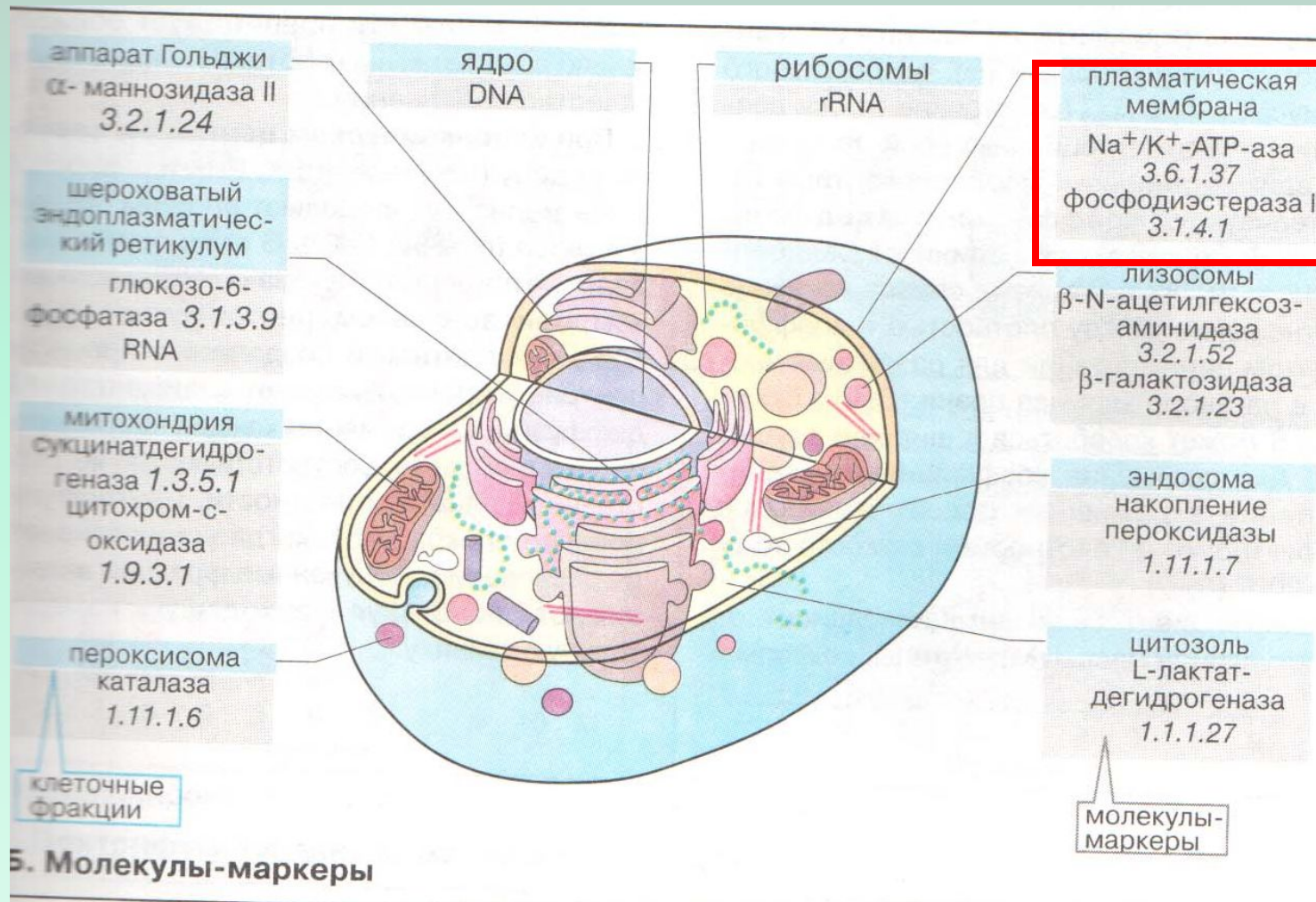


Фракционирование



Измерение

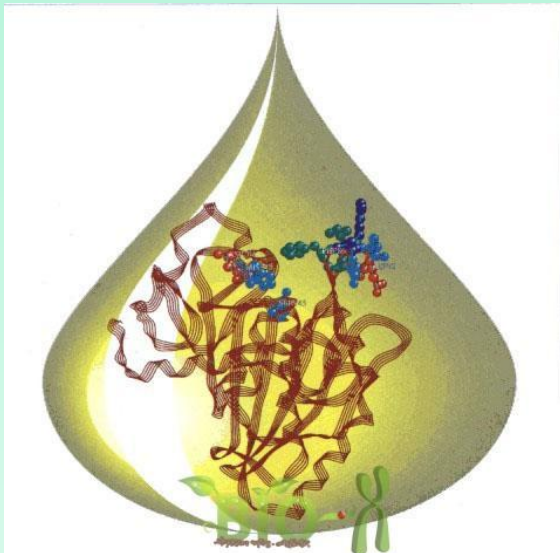
# ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ ПРЕПАРАТОВ (по маркерным ферментам)



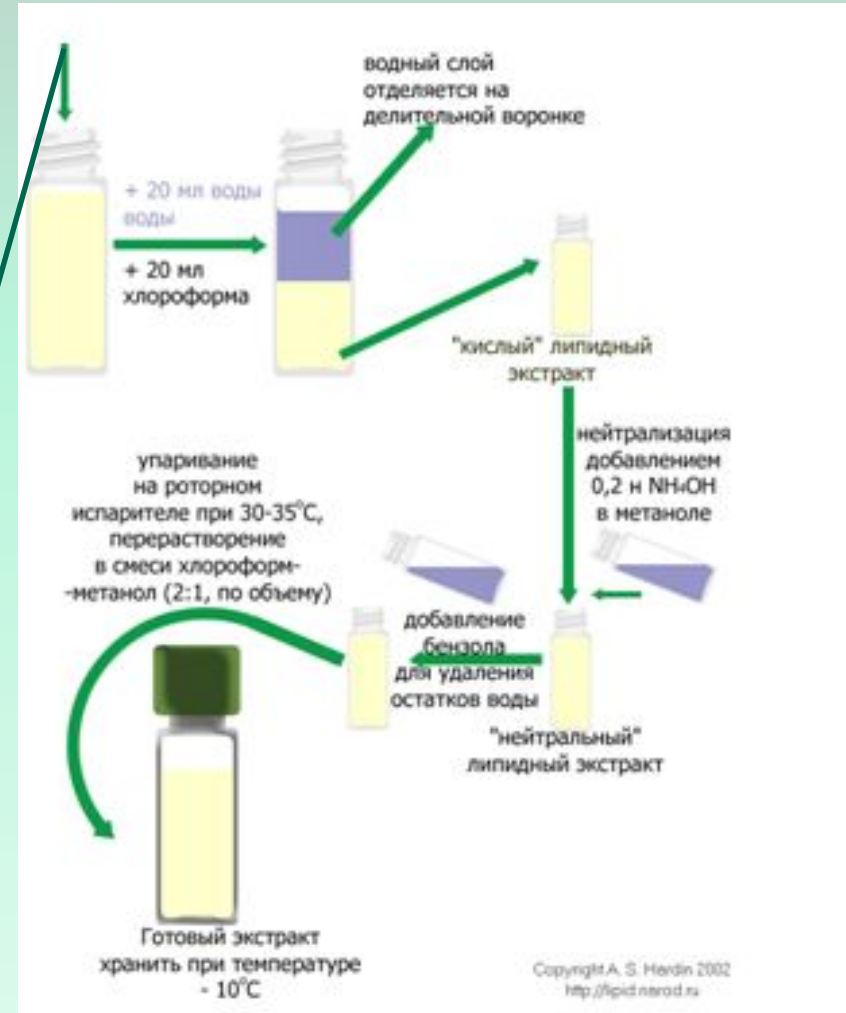
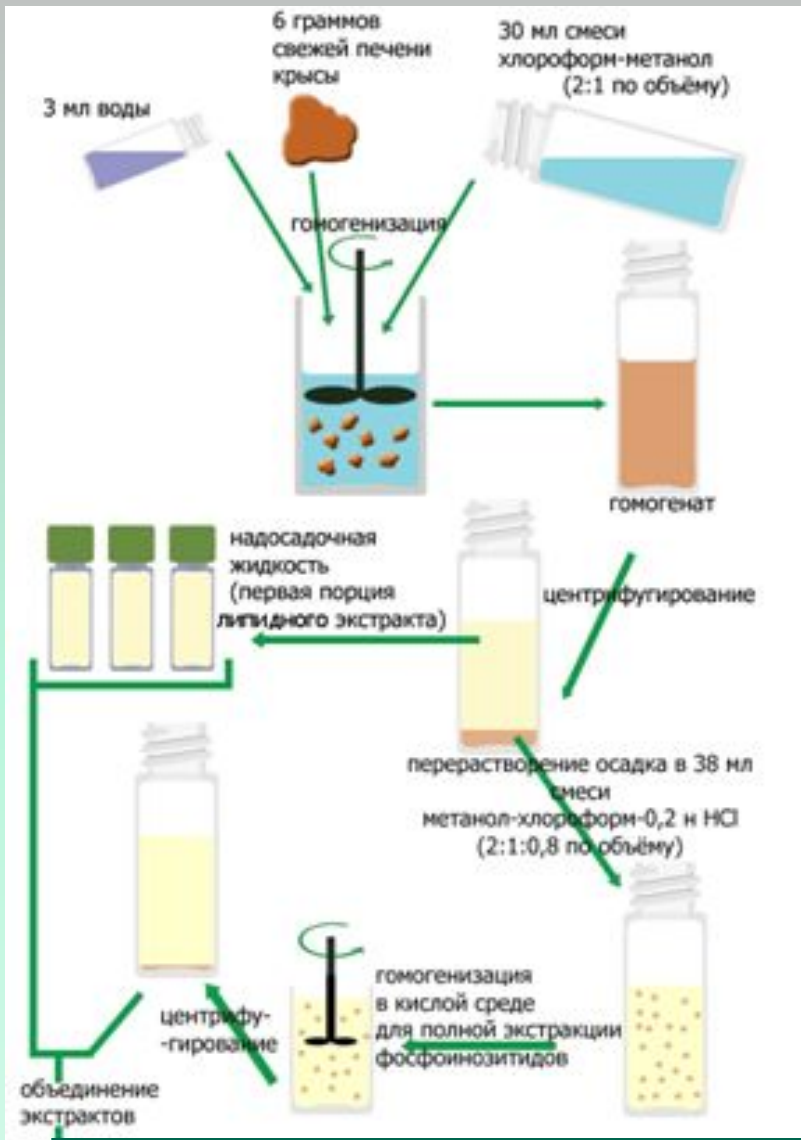
# ИЗУЧЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ



## ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ



# ЭКСТРАКЦИЯ ЛИПИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕСИ ПОЛЯРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ (МЕТАНОЛ, ХЛОРОФОРМ, ЭТАНОЛ)

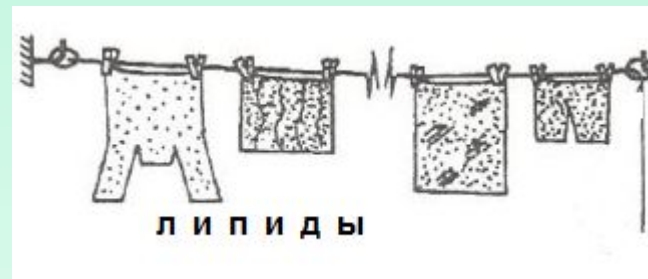


- ДЛЯ УДАЛЕНИЯ НЕЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ  
ПРОМЫВАНИЕ СМЕСИ ЛИПИДОВ

- ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

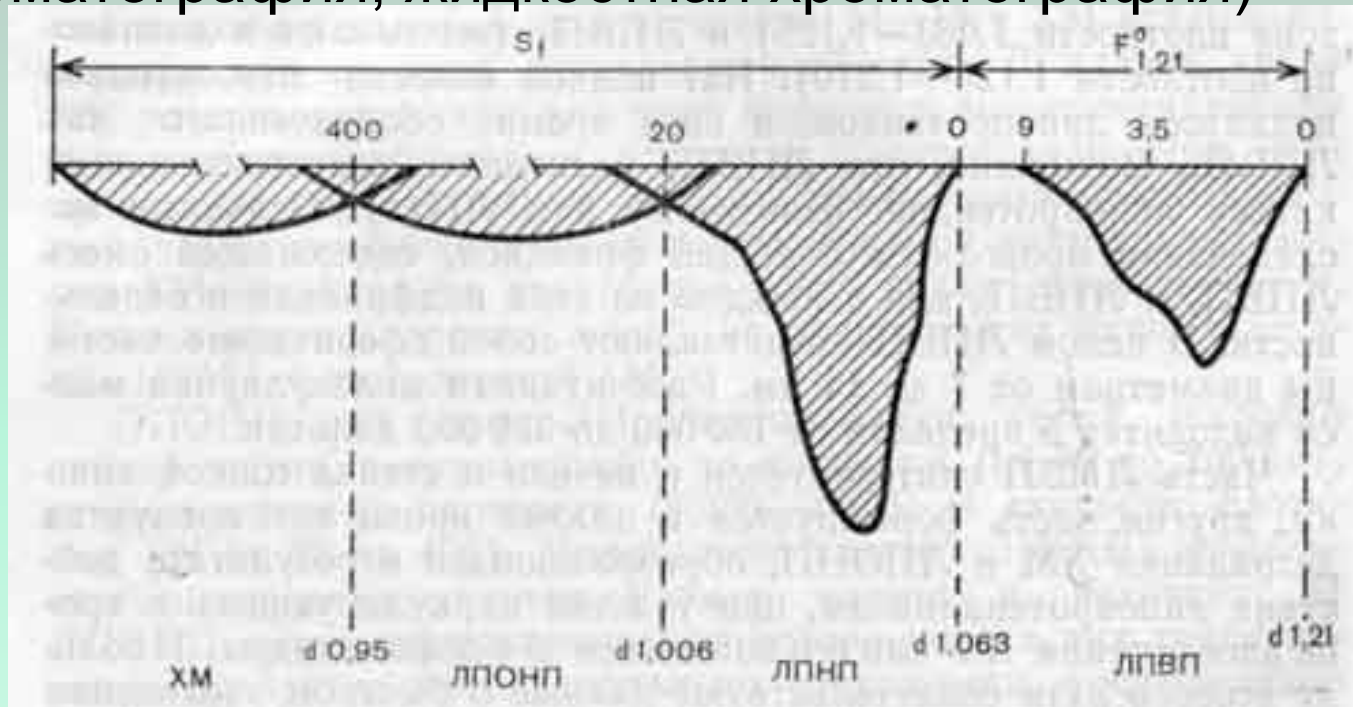


- УДАЛЕНИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ (ВЫСУШИВАНИЕ В ПОТОКЕ АЗОТА ИЛИ СЖАТОГО ВОЗДУХА)



## •РАЗДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ НА КЛАССЫ

(фракционирование по растворимости, тонкослойная хроматография, жидкостная хроматография)



*Разделение основных классов липопротеидов методом аналитического ультрацентрифугирования.*

*S<sub>f</sub> — скорость флотации в флотационных сведбергах при центрифугировании при плотности (d), равной 1,063 г/мл; F° — скорость флотации при плотности, равной 1,21 г/мл.*



# ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



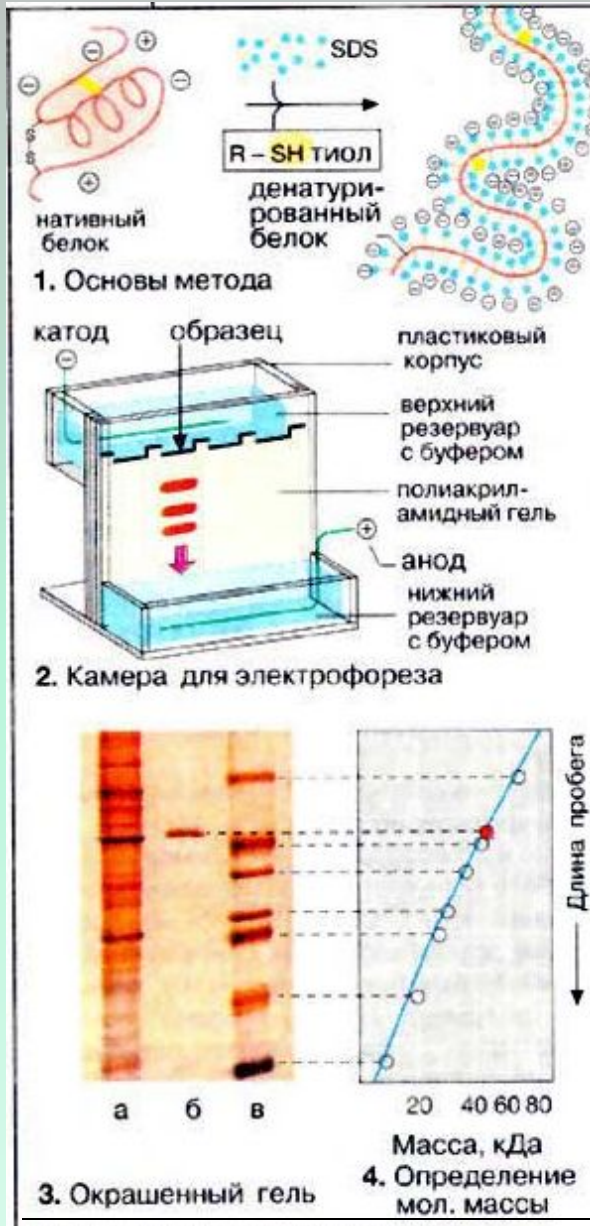
# ВЫДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ СВЯЗАНЫ С ЛИПИДАМИ, ПОЭТОМУ ДЛЯ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗУЮТ **ДЕТЕРГЕНТЫ** («РАЗРУШИТЕЛИ» МЕМБРАН)

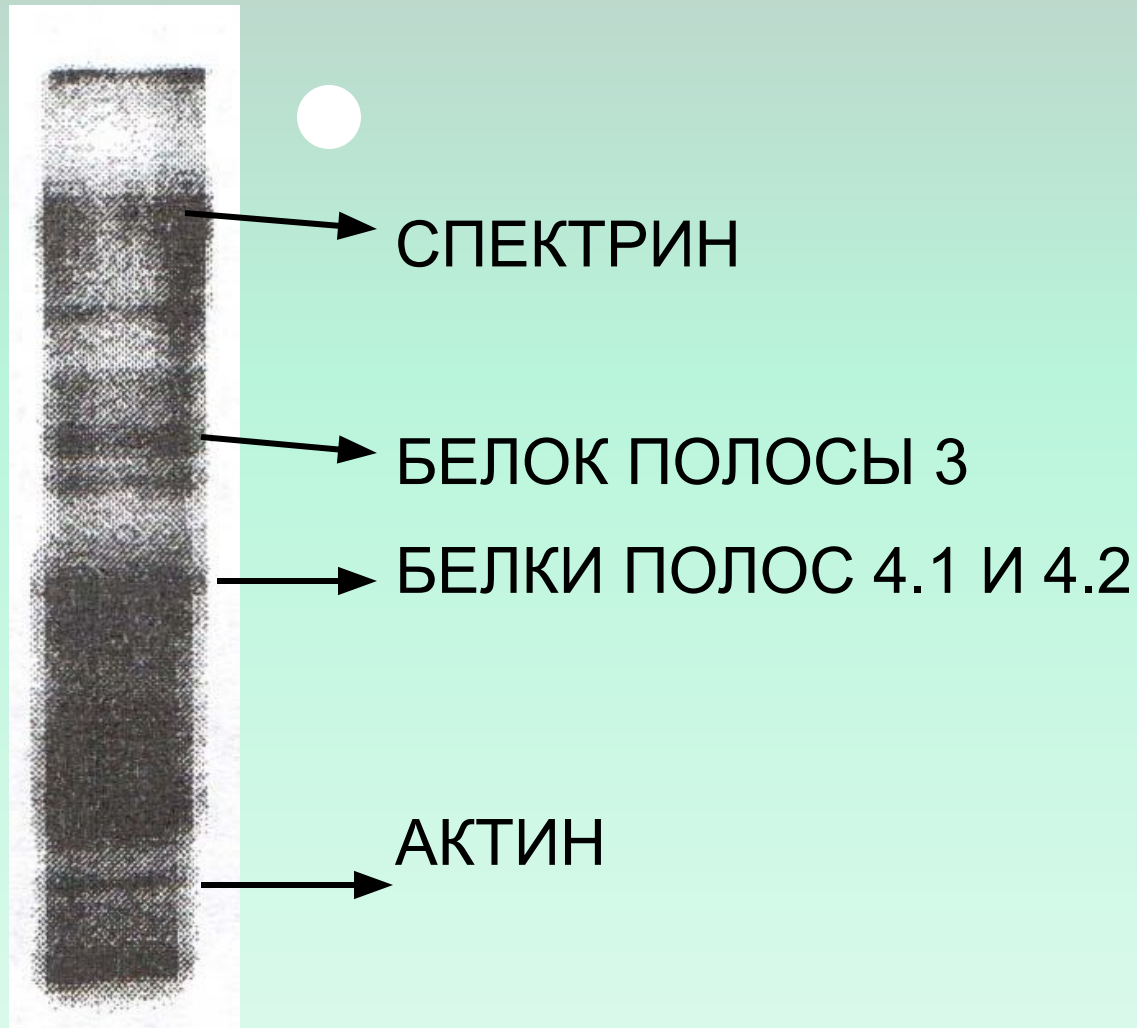
**СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ** – ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОРОДНОГО РАСТВОРА БЕЛКА В ПРИСУТСТВИИ ДЕТЕРГЕНТА

ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВ, ИМЕЮЩИХСЯ В  
МЕМБРАНАХ, ИСПОЛЬЗУЮТ **ЭЛЕКТРОФОРЕЗ** В  
ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ  
ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ.

# ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ



# ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММА БЕЛКОВ ИЗ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ





# РЕКОНСТРУКЦИЯ БЕЛКОВ - ЭТО ВСТРАИВАНИЕ БЕЛКОВ В ЛИПИДНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

## ЭТАПЫ:

□ УДАЛЕНИЕ ДЕТЕРГЕНТА путем промывания



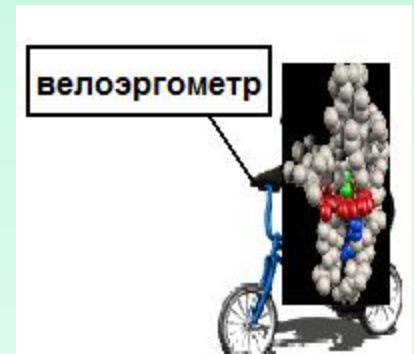
□ СОЗДАНИЕ ЛИПОСОМ

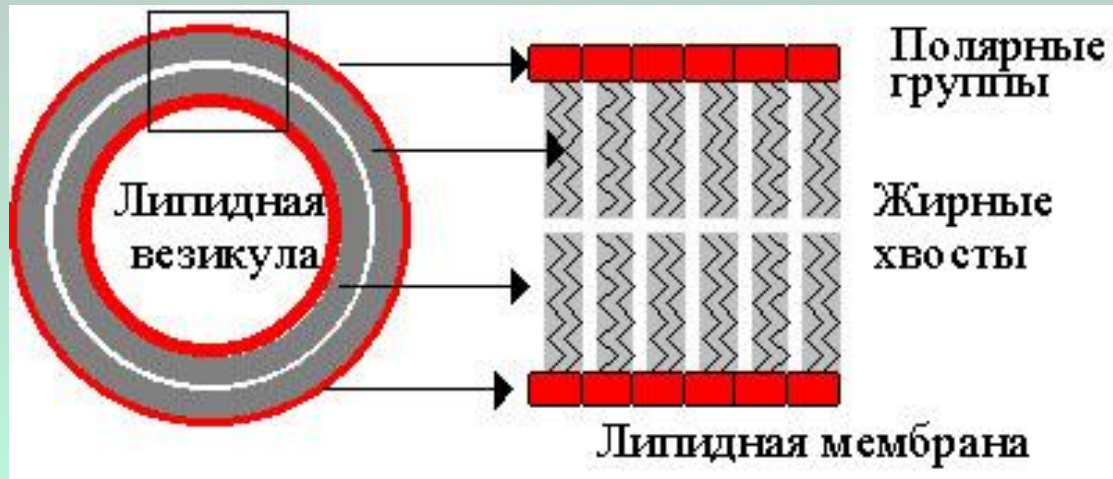


□ ВСТРАИВАНИЕ В НИХ БЕЛКОВ



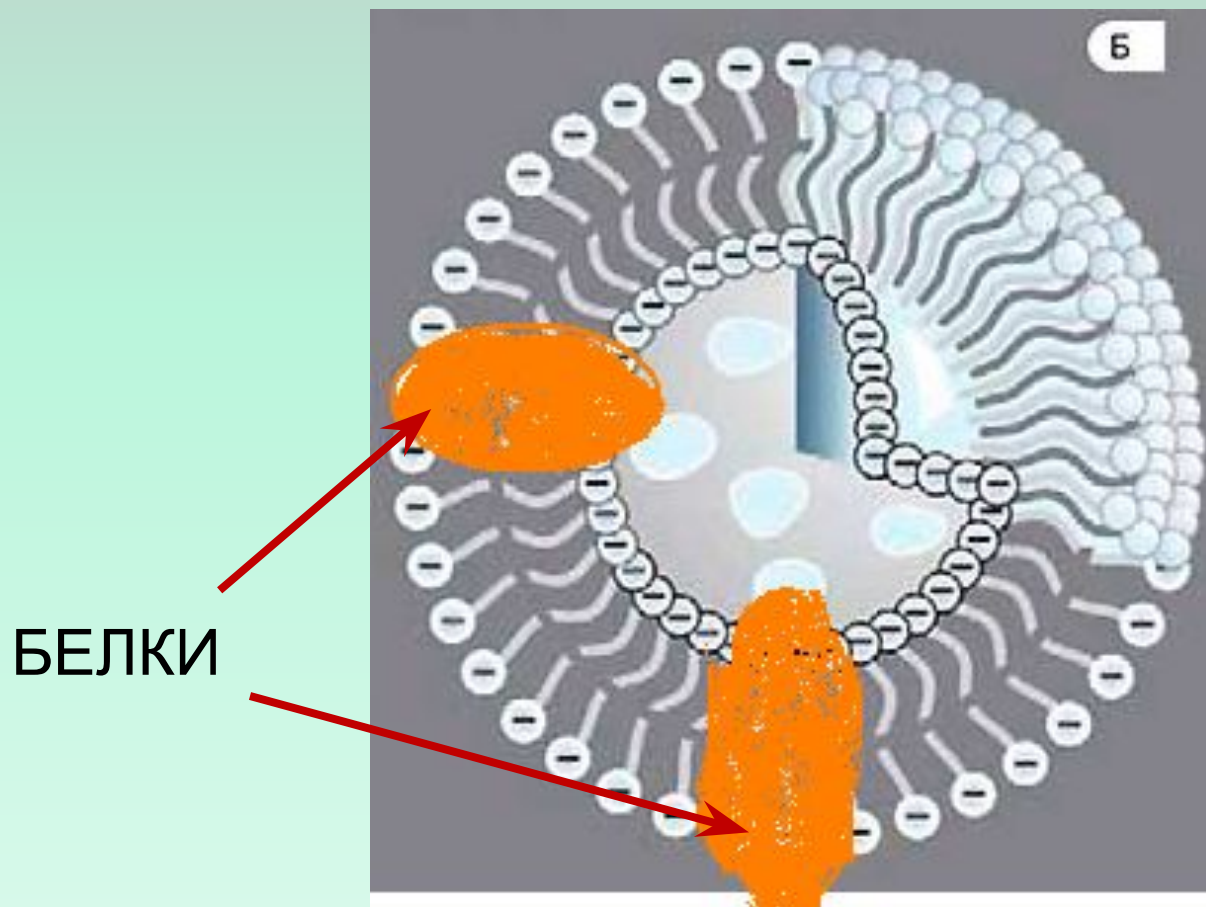
□ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ





**ЛИПОСОМЫ** – ЛИПИДНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ (ПУЗЫРЬКИ), ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ИЗ ФОСФОЛИПИДОВ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

# ВКЛЮЧЕНИЕ БЕЛКОВ В ЗАРАНЕЕ СФОРМИРОВАННЫЕ ЛИПОСОМЫ





# БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ

**МЕТОДЫ**, ДАЮЩИЕ ИНФОРМАЦИЮ О ПОДВИЖНОСТИ  
ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В МЕМБРАНЕ,  
КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕСТРОЙКАХ

- ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС (ЭПР)
- ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС (ЯМР)
- ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

**МЕТОД** ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ  
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ  
МИКРОКАЛОРИМЕТРИЯ