

УДК: 539.23

І.І. Трикур, І.І. Сакалош, З.І. Баторі-Тарці, О.І. Корпош,
Й.П. Шаркань, М.Ю. Січка, І.Й. Цьома, В.М. Різак

Ужгородський національний університет, 88000, Ужгород, вул. Волошина, 54

ВПЛИВ ШТАМУ ГАЛОБАКТЕРІЙ ТА МЕТОДИКИ ОЧИСТКИ НА ОПТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛІВОК БАКТЕРІОРОДОПСИНУ

Проведено дослідження та порівняння характеристик плівкових структур на основі бактеріородопсину, отриманого з різних штамів та при різних часах обробки суспензії ДНК-зою. Встановлено, що кінцеві характеристики плівок залежать від того, з якого штаму отримано БР. Найкращі показники сенситометричної чутливості демонструють плівки, отримані при обробці лізату галобактерій ДНК-зою протягом 3 годин.

Ключові слова: штам галобактерій, бактеріородопсин, пурпурні мембрани, ДНК-за, сенситометрична чутливість.

Вступ

Фотохромні біоорганічні матеріали, до яких відноситься і бактеріородопсин, викликають зацікавленість у зв'язку з можливістю створення функціонально нових елементів оптоелектроніки. Основними перевагами таких матеріалів є відсутність рефрактерного періоду, висока чутливість та практично необмежена реверсивність. З точки зору практичного використання та проведення досліджень найбільш зручними є світлочутливі плівкові структури на базі бактеріородопсину.

Дослідження показали, що характеристики плівкових структур на основі бактеріородопсину можуть суттєво варіюватися в залежності від того який хімічний склад плівки, який матеріал використовується в ролі матриці, яка методика отримання плівок, тощо [1-3]. Не до кінця дослідженим залишається вплив штаму, з якого отриманий БР, та методики його очистки на кінцеві характеристики отриманих плівкових покриттів.

В даній роботі наведено результати досліджень та порівняння оптичних характеристик плівок на основі БР, отриманого з різних штамів галобактерій. Також проведено дослідження залежності характеристик плівок від часу обробки лізату ДНК-зою на етапі очистки БР.

Методи і матеріали

Бактеріородопсин був виділений у формі пурпурних мембран (ПМ) з галобактерій штамів 353П, S9, R₁M₁ та ET1001. Різні штами були взяті з музею, який зберігається в нашій лабораторії. Вирощування, очистка та виділення бактеріородопсину проводилося згідно стандартної методики [4].

Для досліджень використовували плівки на основі бактеріородопсину. Плівкові структури на скляних підкладках одержували із суспензії ПМ з оптичною густиною в межах 30 – 35 (концентрація БР при цьому складала 14.5 кг/м³) методом поливу згідно методики описаної в [5]. В якості матриці використовували фотографічний желатин марки SIGMA.

Дослідження параметрів плівкових структур проводили з використанням установки на основі спектрофотометра Shimadzu UV160U UV-Visible. Засвітка зразка здійснювали за допомогою лампи КГМ (потужність 250 Вт, напруга живлення 24 В, густина потужності 10,8 мВт/см²). Фокусування та спектральна фільтрація випромінювання здійснювалася за допомогою системи лінз і фільтрів СЭВ-21 та ОС-12 На основі кінетичних залежностей коефіцієнта поглинання на характеристичних довжинах хвиль 412 та 570 нм згідно стандартних методик [6]

розраховували наступні параметри плівок: сенситометрична чутливість на певній довжині хвилі (S_{570} , S_{412}), фотоіндуковані зміни оптичної густини (ΔD_{570} , ΔD_{412}), k – коефіцієнт участі молекул БР у фотоциклі та напівперіод життя інтермедіату M_{412} на довжині хвилі 412 нм ($\tau_{1/2}$).

При дослідженні характеристик БР отриманого з різних штамів, культивування, виділення, очистка білку та нанесення плівок проводилося в однакових умовах згідно описаних вище методик. Після чого проводилося дослідження та порівняння характеристик отриманих плівкових структур.

Для дослідження впливу ДНК-зи на оптичні характеристики плівок, використовували БР отриманий з штаму 353П. В даному випадку біомасу з кювети розділяли на три рівні частини, для кожної з яких змінювалася тривалість обробки лізату ферментом на етапі очистки. Після виділення та очистки бактеріородопсину, на його основі отримували плівки і проводили дослідження їх оптичних характеристик.

Вплив штаму на оптичні характеристики плівок БР

На рис. 1 приведені спектри поглинання лізатів біомаси різних штамів галобактерій. Як видно з рисунку, для всіх штамів наявна характерна смуга поглинання в області 570 нм, що свідчить про наявність бактеріородопсину в суспензії. В той же час, різні штами характеризуються різним поглинанням в області 350-400 нм, що свідчить про різну кількість каротиноїдів.

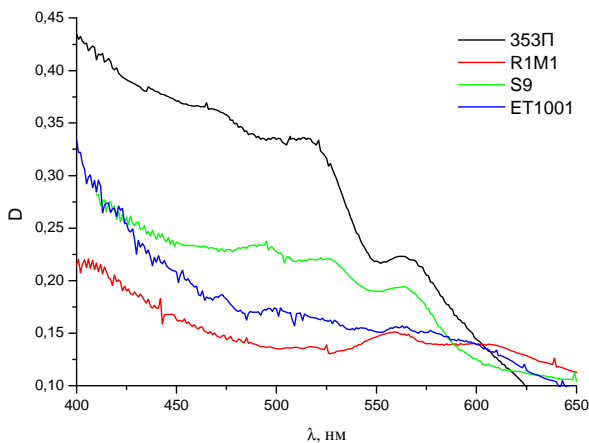


Рис. 1. Спектри поглинання лізатів біомаси різних штамів галобактерій.

Так штам 353П характеризується високою продуктивністю по отриманню БР при великій кількості каротиноїдів, про що свідчить високий рівень поглинання у відповідних областях. В той же час для малокаротиноїдного штаму R_1M_1 кількість бактеріородопсину в рази менша. Відмінність у спектрах поглинання лізатів наводить на думку, що характеристики БР, отриманого з різних штамів, теж можуть відрізнятися.

Традиційно очистка виділеного бактеріородопсину проводиться в декілька етапів, які передбачають центрифугування за різних умов з метою відділити ПМ від інших фрагментів клітинної стінки та залишків внутрішніх частин бактерії[4]. Основним параметром у такому випадку виступає розподіл фракцій по масі, хоча є роботи, які передбачають можливість виділення ПМ з лізату за допомогою двофазних систем, коли основним фактором для сепарації виступають специфічні властивості поверхні мембран, а не їх маса [7]. Використання для очистки маси ПМ, як основної характеристики, приводить до того, що залишкові фрагменти бактерії, подібні по масі до ПМ, при центрифугуванні будуть осаджуватися разом з ПМ. Така ситуація приводить до того, що властивості отриманого БР будуть залежати від того з якого штаму і яким чином він був отриманий. Для перевірки даного твердження ми провели дослідження оптичних властивостей плівок бактеріородопсину отриманого з різних штамів при однакових умовах культивування та очистки. Результати досліджень приведено в таблиці 1.

Як видно з результатів, різні характеристики плівок досить суттєво відрізняються в залежності від того, з якого штаму був отриманий БР. Так БР отриманий з штаму 353П характеризується високою сенситометричною чутливістю та максимальним часом життя інтермедіату M_{412} . Тому такі плівки можна використовувати для запису та зберігання інформації. В той же час для плівок отриманих на основі БР виділеного з штаму R_1M_1 при достатньо високій сенситометричній чутливості час життя інтермедіату M_{412} міні-

мальний. Відповідно такого типу матеріали доцільніше використовувати для детектування та комутації світлових потоків. Отже, для отримання оптимальних характеристик при розробці функціональних біоматеріалів на основі БР, в кожному конкретному випадку необхідно, крім продуктивності штаму враховувати й функціональні особливості отриманого БР.

Таблиця 1

Тип штаму	Оптичні параметри					
	ΔD_{570}	ΔD_{412}	k, %	$S_{570}, \text{см}^2/\text{Дж}$	$S_{412}, \text{см}^2/\text{Дж}$	$\tau_{1/2}, \text{с}$
353П	0,85	0,49	56	485	165	88
ET1001	0,38	0,21	28	296	96	39
R_1M_1	0,41	0,26	30	395	84	14
S-9	0,57	0,36	56	258	145	79

Вплив ДНК-зи на характеристики плівок на основі БР

В різних літературних джерелах приводиться різні часи обробки лізату галобактерій ДНК-зою. Так у роботі [6] проводять діаліз лізату галобактерій з доданою ДНК-зою протягом ночі. Інші автори проводять обробку ферментом протягом 30 хвилин при активному перемішуванні [7]. Для дослідження впливу ДНК-зи на характеристики отриманого БР ми провели порівняння оптичних властивостей плівок БР отриманого з штаму 353П при різних часах обробки ДНК-зою. У таблиці 2 приведені оптичні параметри плівок бактеріородопсину, виділеного при 0,5, 3,0 та 20 годинах обробки лізату ДНК-зою. Обробка проводилася при перемішуванні суспензії на магнітній мішалці.

Таблиця 2

Час обр-ки, год	Оптичні параметри				
	ΔD_{570}	ΔD_{412}	k, %	$S_{570}, \text{см}^2/\text{Дж}$	$S_{412}, \text{см}^2/\text{Дж}$
20	0,52	0,29	26,5	365	111
3	0,85	0,49	56	485	165
0,5	0,44	0,25	27	385	88

Як видно з результатів, час обробки ДНК-азою впливає на оптичні параметри плівок. При різних часах обробки спостерігаються відмінності у fotocутливості плівок та кількості молекул, в яких запускається фотоцикл.

Оптимальними характеристиками володіють плівки отримані при обробці лізату протягом трьох годин. Погіршення характеристик плівок отриманих на основі БР виділеного при довготривалій обробці лізату, може бути пов'язано з тим, що при великих часах обробки повне руйнування молекул ДНК приводить до утворення фрагментів подібних по масі до ПМ. Тому осаджена суспензія ПМ буде містити залишкові фрагменти ДНК, що буде приводити до погіршення чистоти виділеного БР та плівок на його основі. У випадку ж малих часів обробки, неповне руйнування ДНК приводить до збільшення в'язкості лізату і погіршення якості та виходу БР. Тому для поліпшення оптичних параметрів плівок час обробки ДНК-азою необхідно скоротити до оптимального значення, яке визначається процесом розбиванням ДНК галофільних бактерій на великі фрагменти.

Висновки

Підсумовуючи результати проведених досліджень, можна зробити висновок, що як штамп так і методика отримання бактеріородопсину можуть впливати на fotocутливість та якість плівкових структур на його основі. Оптимізація методики вирощування та очистки дозволить покращити характеристики плівок, а правильний підбір штаму дозволить отримати матеріал, який буде максимально задовольняти поставленим вимогам у кожному конкретному випадку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kikineshy A., Bathori-Tarczy Z., Sharkany Y. Materials and devices for fiber optic sensors // Multichip Modules with Integrated Sensors. NATO ASI Series. Series 3. High Technology. – Budapest. – 1995. – P. 181-184.
2. Bandrovskaia I.K., Shershun Yu.D., Bator-Tartsi Z.I., Frolova N.P., Sharkany J.P.

- Special photochrome material on the base of bacteriorhodopsin // SPIE – The International Society for Optical Engineering. International Conference on Optical Storage, Imaging, and Transmission of Information Kiev. – 1996. – P. 91-94.
3. Бандровская И.К., Батори-Тарци З.И., Корпош О.И., Фролова Н.П. Модифікація кінетики фотоциклу бактеріородопсину // Український фізичний журнал. – 2001. – Т.46, №2. – С.161-164.
 4. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane // Method Enzimol. – 1974. – Vol.31. – P. 667-678.
 5. Фотохромний матеріал на основі бактеріородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.007-97, від 25.12.1997.
 6. Плівкові структури фотохромного матеріалу бактеріородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.008 – 97, від 25.12.1997.
 7. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane // Method Enzimol. – 1974. – Vol. 31. – P. 667-678.
 8. Shiu P.-J., Ju Y.-H., Chen H.-M., Lee C.-K. Facile isolation of purple membrane from Halobacterium salinarum via aqueous-two-phase system // Protein Expression and Purification – 2013. – Vol. 89. – P. 219–224.

Стаття надійшла до редакції 28.11.2013

I.I. Trikur, I.I. Sakalosh, Z.I. Bathori-Tarczy, O.I. Korposh, J.P. Sharkany,
M.Y. Sichka, I.Y. Tsoma, V.M. Rizak

Uzhhorod National University, 88000, Uzhhorod, Voloshina Str., 54

INFLUENCE OF THE HALOBACTERIA STRAIN AND PURIFICATION METHODS ON THE OPTICAL PROPERTIES OF THE BACTERIORHODOPSIN FILMS

The study and comparison of the characteristics of film structures on the basis of bacteriorhodopsin obtained from different halobacteria strains and at different times of lysate treatment by DNA-ase was made. It has been established that the final properties of the films depend on the strain from which received the BR. The best results of optical sensitivity obtained for films which was made from BR prepared by processing lysate of halobacteria by DNA-ase for 3 hours.

Keywords: strain of halobacteria, bacteriorhodopsin, purple membrane, DNA-ase, sensitometric sensitivity.

И.И. Трикур, И.И. Сакалош, З.И. Батори-Тарци, О.И. Корпош,
Й.П. Шаркань, М.Ю. Сичка, И.Й. Цьома, В.М. Ризак

Ужгородский национальный университет, 88000, Ужгород, ул. Волошина, 54

ВЛИЯНИЕ ШТАММА ГАЛОБАКТЕРИЙ И МЕТОДИКИ ОЧИСТКИ НА ОПТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛЕНОК БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Проведено исследование и сравнение характеристик пленочных структур на основе бактерiorодопсина, полученного из различных штаммов галобактерий и при разном времени обработки лизата ДНК-зой. Установлено, что конечные характеристики пленок зависят от того, из какого штамма получен БР. Лучшие показатели сенситометрической чувствительности демонстрируют пленки, полученные при обработке лизата галобактерий ДНК-зой в течение 3 часов.

Ключевые слова: штамм галобактерий, бактерiorодопсин, пурпурные мембраны, ДНК-за, сенситометрическая чувствительность.