

3. Сунь Тун, Деревицкая В. А., Роговин З. А. Синтез новых производных целлюлозы и других производных полисахаридов.— ВМС, 1960, т. 2, вып. 12.
4. Хроматография на бумаге/Под ред. И. М. Хайс, К. Мацека.— М.: ИЛ, 1962.
5. Сунь Тун, Чекалин М. А., Роговин З. А. Новый метод получения химически окрашенных волокон.— Журн. прикл. химии, 1961, т. 34, № 1.
6. Emanuel E., Helene R., Gaetan G. 4-azidoaniline, a versatile protein and peptide modifying agent for photoaffinity labelling.— Helv. Chim. Acta, 1979, vol. 64, p. 1217.
7. Jaffe C. L., Lis H., Sharon N. New cleavable photoreactive heterobifunctional cross-linking reagents for studying membrane organization.— Biochem., 1980, vol. 19, p. 4423.
8. Починок А. В. и др. Исследование светочувствительности некоторых ароматических и гетероароматических азидов.— Укр. хим. журн., 1979, т. 45, № 12.

Поступила в редакцию 8 апреля 1983 г.

УДК 773.79 : 577.15.087.9

М. И. ДОБРИКОВ, Г. В. ШИШКИН
(Новосибирск)

ФОТОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ФОТОИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ. ЗАВИСИМОСТЬ ФОТОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОТ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЗАКРЕПЛЕНИЯ, УСИЛЕНИЯ И ПРОЯВЛЕНИЯ СКРЫТОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

Способы фотоиммобилизации ферментов достаточно хорошо проанализированы в литературе [1, 2]. Ковалентная иммобилизация ферментов под действием света — первичная фотохимическая стадия фотопроцесса, квантовый выход которой не может быть больше 1. Основное усиление светового сигнала достигается в ходе каталитической или автокаталитической ферментативной реакции, где коэффициент усиления за короткое время может достигать 10^6 — 10^{12} [3], что находится на уровне галогеносеребряной фотографии. Для всех бессеребряных фотоматериалов на основе фотоиммобилизованных ферментов закрепление, усиление и проявление являются обязательными операциями. Они определяют максимально достижимый коэффициент усиления и целесообразность применения ферментативных фотоматериалов.

Цель данной работы — рассмотрение влияния условий проведения закрепления, усиления и проявления скрытого изображения на сенситометрические характеристики фотоэнзимоматериалов.

Закрепление скрытого изображения обуславливает соотношение сигнал — фон. Следовательно, обеспечение высокого качества отмывки от ковалентно несвязанного фермента является необходимым условием получения высокой светочувствительности фотоматериалов с ферментативным усилением. При экспонировании фотоматериала в пределах прямолинейного участка характеристической кривой с носителем ковалентно связывается $5 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-4}\%$ нанесенного фермента. Если необходим коэффициент ферментативного усиления 10^6 , то эффективность отмывки, т. е. отношение исходной концентрации фермента к конечной в пробельных участках, должна быть $10^9/10^4\% = 10^{10}$. Видно, что на эту операцию приходится очень большая нагрузка, следовательно, ее проведению нужно уделять особое внимание. Задача осложняется тем, что ферменты — высокомолекулярные соединения с заметной физической сорбцией на полимерных носителях. Лабильность ферментов не позволяет применять жесткие отмывки, которые эффективно вымывают белки, но приводят к их необратимой инактивации, т. е. к потере каталитической активности.

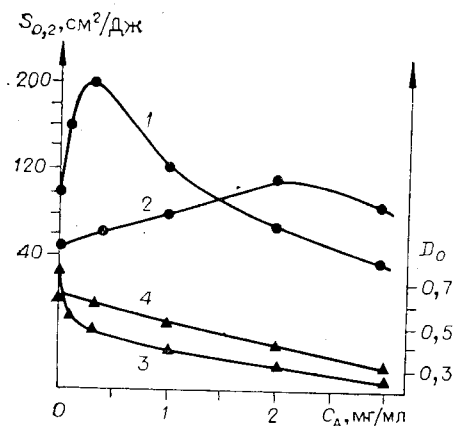
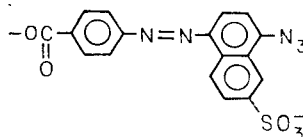


Рис. 1. Зависимости светочувствительности $S_{0,2}$ и фотографической вуали (D_0) от концентрации альбумина (C_A):

кривые с точками — зависимость $S_{0,2}$ от C_A : без дополнительной отмывки альбумина, 2 — с одной отмывкой альбумина раствором Тритона X-100 (5 г/л) и дезоксихолата натрия (2 г/л), pH 8,2; кривые с треугольниками — зависимость D_0 от C_A : 3 — без отмывки альбумина, 4 — с одной отмывкой.

мерного носителя использовались производные целлюлозы, так как они хорошо проницаемы для больших молекул ферментов; на целлюлозных носителях денатурация биокатализаторов меньше, чем на других сорбентах, и возможна полная десорбция поглощенных белков в достаточно мягких условиях [4]. Скрытое фотографическое изображение получали путем фотоиммобилизации фермента на светочувствительном носителе. В ходе проведения фотоиммобилизации было установлено, что при модификации целлюлозы гидрофобными остатками фотокомпоненты происходит гидрофобизация носителя. Неспецифическая физическая сорбция ферментов на модифицированном светочувствительном носителе увеличивается. Для подавления этого эффекта в фотокомпоненту вводили ионогенную группу, т. е. *p*-дiazобензоилцеллюлозу, полученную согласно [5], сочетали с 1-нафтиламино-7-сульфокислотой, аминогруппу азокрасителя диазотировали и замещали на $-N_3$. В итоге получали фотоматериал с

кислотным азидазокрасителем



в качестве

фотокомпоненты, у которого фотографическая вуаль на 0,1 о. е. ниже, чем у материала с фотокомпонентой без ионогенной сульфогруппы.

Малоочищенные препараты ферментов содержат большое число разнообразных примесей. При очистке фермента с помощью гель-фильтрации было установлено, что большинство примесей — низкомолекулярные олигопептиды, которые несущественно влияют на светочувствительность и фотографическую вуаль. Для удаления сильно сорбирующихся высокомолекулярных агрегатов, обладающих ферментативной активностью, раствор фермента перед нанесением на светочувствительный слой фильтровали через носитель, что улучшало соотношение сигнал — фон более чем на порядок.

Снижение физической сорбции фермента на носителе достигалось обработкой последнего нейтральным белком — бычьим сывороточным альбумином, по молекулярному весу близким к фосфомоноэстеразе (ФМЭ). Этот белок занимал на носителе наиболее активные центры физической сорбции, что уменьшало фотографическую вуаль. На рис. 1 даны зависимости $S_{0,2}$ и D_0 фотоматериала от концентрации альбумина (C_A). При C_A меньше 1 мг/мл наблюдается заметное увеличение $S_{0,2}$ и существенное уменьшение D_0 . Увеличение C_A больше 1 мг/мл уменьшает $S_{0,2}$ при дальнейшем снижении D_0 . Можно было предположить, что с тех центров физической сорбции, с которых в мягких условиях отмывается альбумин, должен отмываться и фермент. Тогда после проведения такой отмывки $S_{0,2}$ будет увеличиваться за счет освобождения от альбумина некоторых центров светочувствительности, но D_0 при этом не должна увеличиваться. Из приведенных данных видно, что отмывка альбумина в мягких усло-

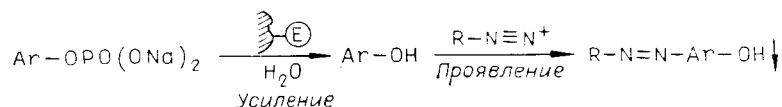
виях смещает максимум светочувствительности в сторону увеличения S_A , но не позволяет получить более высокого значения $S_{0,2}$. По-видимому, альбумин обладает по сравнению с ФМЭ несколько иными сорбционными свойствами и не полностью моделирует ее на целлюлозном носителе.

Для увеличения эффективности отмывки фермента после фотоиммобилизации применяли растворы детергентов. Основное количество несвязавшегося фермента отмывается растворами с высокой ионной силой, но некоторое количество фермента прочно сорбируется и начинает проявляться в виде фотографической вуали. Растворы катионных (Цетавлон) и анионных (додецилсульфат) детергентов вымывают адсорбированный белок, но инактивируют ФМЭ в 3—5 раз. Наиболее подходящими оказались смеси мягких неионных детергентов типа Тритон X-100, Твин-20 с природными детергентами типа холиевой и дезоксихолиевой кислот, которые эффективно вымывают ФМЭ и практически не вызывают ее инактивации.

Применение всех указанных способов уменьшения фотографической вуали позволяет получить фотоматериалы с $D_0 < 0,25$ при длительном времени проявления (1 ч).

Заметное влияние на сенситометрические характеристики фотоматериала высокомолекулярных ферментативных агрегатов и нейтральных белков с достаточно большим молекулярным весом, а также несущественное влияние низкомолекулярных (молекулярный вес менее 40 000) олигопептидов позволяют сделать вывод о том, что, по-видимому, первоначально белки адсорбируются на светочувствительном носителе (причем более высокомолекулярные адсорбируются сильнее) и при экспонировании фотоматериала предпочтительнее происходит фотоиммобилизация более сорбирующихся белков. Простой способ удаления высокомолекулярных агрегатов, обладающих ферментативной активностью, и слабое влияние на светочувствительность других примесей дают возможность использовать доступные малоочищенные ферментативные препараты, что значительно расширяет возможности применения данного способа получения фотографического изображения. Например, в качестве фермента в настоящей работе служил препарат ФМЭ из кишок цыплят с удельной активностью 0,4 ед. акт./мг. Чистая ФМЭ обладает значительно более высокой ферментативной активностью ~1500 ед. акт./мг, но и более высокой стоимостью.

ФМЭ не относится к высокоактивным ферментам, но мы выбрали ее для усиления скрытого изображения по той причине, что для этого фермента известно несколько хороших способов гистохимической визуализации продуктов ферментативной реакции [6]. Усиление скрытого изображения в ходе ферментативной реакции происходит следующим образом. В проявляющий буферный раствор вводят аналоги природных субстратов фермента. Для ФМЭ это различные фенил-, индолил- и нафтилфосфаты:



Под каталитическим действием одной молекулы фермента происходит гидролиз большого числа молекул субстрата до соответствующих фенолов, индолов и нафтолов, которые затем можно визуализировать азосочетанием со стабилизированными солями диазония с образованием видимого изображения. Строение субстрата (Ar—) в значительной мере определяет скорость протекания ферментативной реакции. Из арилфосфатов, способных в дальнейшем вступать в реакцию азосочетания, наиболее быстро гидролизуются фенил- и α -нафтилфосфаты. Для визуализации продуктов ферментативного гидролиза использовался метод одновременного азосочетания, который по литературным данным [7] имеет более высокую

Таблица 1

Продукт ферментативной реакции	Соль диазония				
	Красный TR	Фиолетовый В	Синий RR	Голубой В	Черный К
Фенол α -нафтол Азатол AS—BS	Желтый Коричневый Красный	Коричневый Черный Фиолетовый	Коричневый Черный Фиолетовый	Коричневый Коричневый Фиолетовый	Фиолетовый Фиолетовый Синий

чувствительность по сравнению с другими гистохимическими методами. В этом методе стабилизированная соль диазония присутствует в проявляющем растворе изначально и усиление, и проявление скрытого изображения протекают одновременно. Для проявления ФМЭ наиболее пригодны следующие соли диазония: фиолетовый прочный В, красный прочный TR, синий прочный RR и черный прочный С [7], которые наиболее стабильны в щелочных условиях проявления, дают окрашивание глубоких тонов и хорошего качества и по сравнению с другими солями диазония меньше всего инактивируют фермент. В табл. 1 представлена зависимость цвета изображения от продукта ферментативной реакции и соли диазония. Сочетание реагентов α -нафтилфосфат с фиолетовым прочным В и синим прочным RR позволяет получать черно-белое изображение. В растворе инактивация ФМЭ этими солями диазония незначительна: в течение часа менее 25%. На фотоматериале наблюдается несколько иная картина. На рис. 2 приведены зависимости $S_{0,2}$, γ и D_0 от времени проявления скрытого изображения. $S_{0,2}$ заметно увеличивается только в первые 20 мин, затем практически стабилизируется. Это свидетельствует о том, что каталитическая активность фермента в ходе проявления резко снижается. Если проводить усиление скрытого изображения в отсутствие соли диазония, то уменьшения каталитической активности фермента не наблюдается. Следовательно, соль диазония каким-то образом влияет на фермент. В табл. 2 приведена зависимость сенситометрических характеристик фотоматериала от соли диазония. Соли диазония расположены в ней в порядке увеличения их активности в реакции азосочетания [7]. Следовательно, чем ниже активность солей диазония, тем выше $S_{0,2}$. Это объясняется тем, что скорость азосочетания α -нафтола в щелочных условиях с указанными солями диазония ($\tau_{1/2} = 10^{-3} - 10^{-4}$ с) [7] намного выше, чем скорость ферментативной реакции ($K_{кат} = 10^2$ с $^{-1}$) [8], и образование красителя в полимерном слое, где замедлена диффузия, происходит непосредственно внутри активного центра фермента, что приводит к полной его инактивации. Использование еще менее активных солей диазония позволит, вероятно, более полно реализовать каталитические свойства фермента и улучшить фотографические характеристики.

Зависимость D_0 на рис. 2 от времени проявления напоминает зависимость $S_{0,2}$. В отличие от галогеносеребряной фотографии D_0 резко не возрастает при больших временах проявления, что, в принципе, позволяет повысить $S_{0,2}$ увеличением времени проявления.

Зависимость γ от времени проявления имеет куполообразный вид, что обусловлено тем, что при $D > 0,5$ накопление красителя на фотослое не вызывает адекватного увеличения D . Это хорошо видно на рис. 3.

Найдено, что наиболее удачной комбинацией реагентов для закрепления, усиления и проявления скрытого изображения, полученного фото-

Таблица 2

Соль диазония	$\lambda_{обл}$, нм	D_0	γ	$S_{0,2}$, см 2 /Дж
Синий прочный RR	350—450	0,30	0,55	680
Фиолетовый прочный В	350—450	0,29	0,50	400
Красный прочный TR	350—450	0,27	0,40	120

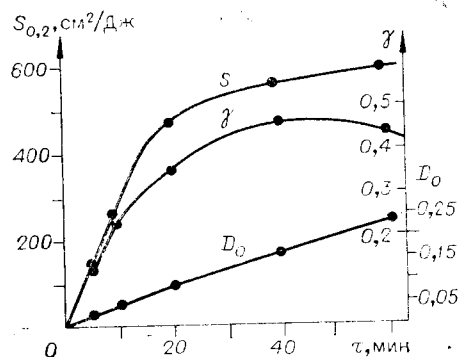


Рис. 2. Зависимость светочувствительности $S_{0,2}$, коэффициента контрастности (γ) и фотографической вуали (D_0) от времени проявления (τ) скрытого изображения.

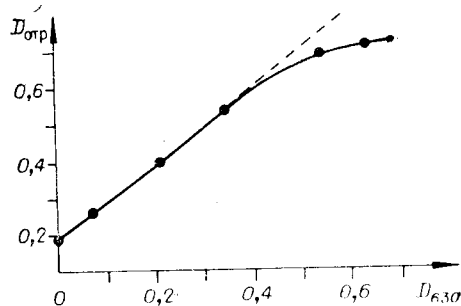


Рис. 3. Зависимость оптической плотности фотоматериала в отраженном свете ($D_{отр}$) от количества красителя (D_{630}), образующего видимое изображение. Количество красителя определялось спектрофотометрически.

иммобилизацией ФМЭ на 4-(4'-азидо-6'-сульфонафтилазо)-бензоилцеллюлозе, являются отмывающие растворы, содержащие Тритон X-100 и дезоксихолат натрия, и проявляющие растворы, содержащие α -нафтилфосфат и синий прочный RR, которые позволяют получать черно-белый бес-серебряный фотоматериал с сенситметрическими характеристиками, приведенными в табл. 3. Материал дает полутоновое изображение контактным способом с использованием в качестве источника света обычных фотоувеличителей, но его светочувствительность относительно невысока и нуждается в дальнейшем увеличении. Для того чтобы выявить возможности дальнейшего увеличения $S_{0,2}$, оценим экспериментально достигнутый коэффициент усиления скрытого изображения в ходе ферментативной реакции. Теоретически, применяя ФМЭ, можно получить за час проявления $K = 10^2 \text{ с}^{-1} \cdot 3,6 \cdot 10^3 \text{ с} = 3,6 \cdot 10^5$. Для оценки экспериментально достигнутого K образцы размером в 1 см^2 экспонировали, скрытое изображение закрепляли, по остаточной ферментативной активности с вычетом активности фотографической вуали определяли концентрацию фотоиммобилизованного фермента ($1,4 \cdot 10^{-12} \text{ моль/см}^2$) по [8]. Скрытое изображение усиливали и проявляли в течение часа. Образовавшийся краситель смывали ацетоном и спектрофотометрически ($\lambda = 630 \text{ нм}$, $\epsilon = 10^4$) оценивали его концентрацию ($2 \cdot 10^{-7} \text{ моль/см}^2$). Следовательно, в этих условиях достигается $K = 1,5 \cdot 10^5$, что только в 2,5 раза меньше теоретического значения. Это значит, что ферментативная система усиления скрытого изображения работает почти с максимально возможной эффективностью, а наблюдаемая относительно низкая светочувствительность фотоматериала обусловлена в основном низкой эффективностью фотоиммобилизации, т. е. получения скрытого изображения. Дальнейшее увеличение светочувствительности фотоэнзимоматериалов возможно двумя путями: увеличением эффективности фотоиммобилизации и заменой ферментативной системы усиления на более активную.

Таблица 3

D_0	D_{max}	γ	Спектральная светочувствительность S , $\text{см}^2/\text{Дж}$						Общая светочувствительность в интервале $400 \div 600 \text{ нм}$, $(\text{лк} \cdot \text{с})^{-1}$
			$\lambda_{\text{обл}}, \text{нм}$						
			313—334	365	405	436	450—500	546	
0,25	1,40	0,65	150	950	400	300	100	50	0,0002

ЛИТЕРАТУРА

1. Имобилизованные ферменты/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартиника.— М.: Мир, 1976.
2. Самохин Г. П., Клебанов А. М., Мартинек К. Фотохимическая иммобилизация ферментов.— Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия, 1978, т. 19, № 4.
3. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Казанская Н. Ф., Никольская И. Н. Светочувствительные каталитические системы.— Успехи науч. фотогр., 1978, т. 19, с. 255.
4. Лурье А. А. Сорбенты и хроматографические носители.— М.: Химия, 1972, с. 127.
5. Сунь Тун, Чекалин М. А., Роговин З. А. Новый метод получения химически окрашенных волокон.— Журн. прикл. химии, 1961, т. 34, № 1.
6. Берстон М. Гистохимия ферментов.— М.: Мир, 1965.
7. Пирс З. Гистохимия.— М.: ИЛ, 1962.
8. Бармина Л. В., Зайчиков Е. Ф., Старостина В. К. Сравнение кинетических свойств растворимой и иммобилизованной щелочной фосфотазы из *E. Coli*.— Биохимия, 1974, т. 39, № 4.

Поступила в редакцию 8 апреля 1983 г.

УДК 666.266.5 : 772.99

А. А. АНИКИН, А. А. СОКОЛОВ

(Новосибирск)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМЫ ЧАСТИЦ ФОТОЛИТИЧЕСКОГО СЕРЕБРА ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ

Введение. В последнее время широко ведутся исследования различных светочувствительных материалов. Заметное место среди них занимают материалы, в которых под действием света образуются мельчайшие металлические частицы. Это, главным образом, галогеносеребряные эмульсии, галогеносеребряные и галогеномедные фотохромные стекла и пленки. Непосредственное наблюдение частиц с помощью электронной микроскопии во многих случаях затруднительно, поэтому анализ спектров поглощения является основным способом получения качественной информации о процессах образования и трансформации металлических частиц. Справедливость сделанных при этом выводов, естественно, определяется обоснованностью модельных представлений.

До сих пор многие специалисты исходят из теории Ми, согласно которой смещение максимума спектра поглощения в сторону длинных волн должно означать увеличение размера частиц, а сдвиг в коротковолновую область — уменьшение. Этот эффект, однако, имеет место лишь для достаточно крупных частиц $d \sim 20 \div 60$ нм. Следует заметить, что образование столь крупных металлических частиц в рассматриваемых материалах в одних случаях невозможно, в других — маловероятно.

В работе [1] было показано, что спектры дополнительного поглощения, возникающие при фотолитизе галогенов серебра, можно объяснить образованием сплюснутых частиц серебра весьма малого размера ($\sim 2-4$ нм). Смещение максимума поглощения в длинноволновую область в этом случае объясняется увеличением степени несферичности частиц, а обратная ситуация — их округлением. При облучении галогеносеребряных фотохромных стекол был обнаружен эффект фотонаведения анизотропии, качественно и количественно подтверждающий наличие сплюснутых частиц [2, 3].

Таким образом, при анализе спектров поглощения серебряных частиц, выделяющихся как в объеме, так и на поверхности кристаллов галоидного серебра, необходимо учитывать возможность образования частиц несферической формы. Удобным приближением для учета несферичности является модель эллипсоидальных частиц. В настоящей работе детально рас-