

Accurate detection and determination of nitrogen-containing metabolites in biofluids and tissues which have concentrations in the millimolar and more low range was not successful without special instrumentations and techniques. Such improved measurements can be used to quantify the absolute and relative abundance of metabolites and to determine the motional properties of some of them. Thus ^{14}N NMR spectroscopy in the case of using sufficiently effective multipulse sequences may be used in biochemical and clinical practice.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОКАРІОТИЧНИХ КЛІТИН МЕТОДОМ ЯМР ^{14}N IN VIVO

С. Тяхтенко (кафедра хімії НаУКМА),
М. Патраучан, Г. Іващенко, І. Геблер (Інститут колоїдної
хімії та хімії води НАН України)

Сигнали ЯМР азоту-14 в сполуках з симетричним оточенням ядер азоту, таких як NH_4^+ , холін (Х), фосфатидилхолін (ФХ), амінокислоти та ін., спостерігаються відносно вузькими, тоді як сигнали в сполуках з несиметричним оточенням азоту, таких як креатин та фосфатидилетаноламін (ФЕ), дуже розширені. Ці особливості ^{14}N ЯМР-характеристик триметиламінів (Х та ФХ), амінокислот та NH_4^+ дозволяють проводити неінвазивне визначення їх відносних концентрацій в інтактних клітинах та тваринах, як протягом коротких, так і тривалих експериментів. В даній роботі досліджена можливість використання спектроскопії ядерного магнітного резонансу на ядрах азоту-14 для моніторингу концентрацій азотовмісних сполук в прокаріотичних клітинах *in vivo* та *in vitro*.

В дослідженні були використані музейні штами грам-позитивних і грамнегативних бактерій та штами бактерій деструкторів аніонних поверхнево-активних речовин. В якості грамнегативних були досліджені бактерії роду *Pseudomonas*, а грам-позитивних - бактерії роду *Bacillus*. Для проведення ЯМР-експериментів вирощувалась нічна культура на L-бульйоні, яка потім збиралася шляхом центрифугування та двічі відмивалась фосфатним буфером. Після цього 1-2 грами сирової біомаси суспендували в 3 мл фосфатного буферу та одержану суспензію вміщували в циліндричну ЯМР-ампулу діаметром 10мм. Спектри ЯМР ^{14}N були записані на частоті 14,46 МГц на імпульсному Фур'є спектрометрі Bruker СХР-200 в режимі експериментів високої потужності з викорис-

танням датчика з поперечним розташуванням соленоїдальної котушки. Такий датчик дозволяє досягнути максимальної чутливості експерименту для еквівалентного об'єму зразка в порівнянні з іншими конструкціями. Окрім того, така конструкція дозволяє зменшити викривлення базової лінії, викликані акустичними шумами. Для ефективної мінімізації акустичних артефактів використовувалась трьохімпульсна послідовність RIDE. Тривалість 90-градусного імпульсу становила 15 мікросекунд, ширина спектра 20 КГц. Значення хімічних зсувів вимірювались відносно нітрат-іону, як зовнішнього стандарту. Всі експерименти проводились при фізіологічних температурах. Ідентифікація ліній ЯМР ^{14}N виконана з використанням спектрів модельних сполук та на основі характеристичності значень хімічних зсувів та ширини ліній.

В спектрах бактеріальних клітин були проідентифіковані резонансні лінії азоту триметиламінових груп, що належать мембранним ФХ, а також лінії, що відповідають аміногрупам вільних амінокислот та іонам NH_4^+ . Резонансні лінії ФЕ на відміну від ФХ в спектрах, за зазначених вище умов, не детектуються завдяки низькій симетрії найближчого оточення атома азоту, яка приводить до критичного розширення ліній. Оскільки грампозитивні бактерії містять у своїх мембранах ФХ, а грамнегативні містять ФЕ, то існує можливість диференціювання цих бактерій на молекулярному рівні за даними спектроскопії ЯМР на ядрах азоту-14.

Таким чином, реєстрація вузької резонансної лінії в діапазоні 328 -330 м.ч. дає нам підставу стверджувати, що це грампозитивні бактерії, а відсутність лінії в цьому інтервалі хімічних зсувів свідчить про наявність грамнегативної культури бактерій. На відміну від існуючих традиційних засобів диференціювання грампозитивних та грамнегативних бактерій, в яких використовуються фіксовані неживі клітини, запропонований метод дозволяє проводити визначення бактерій *in vivo*. Методу властива висока специфічність, але він потребує значної кількості біомаси.

Отже, застосування спектроскопії ЯМР на ядрах азоту-14 дає можливість не тільки визначення відносних концентрацій азотовмісних метаболітів в бактеріальних клітинах *in vivo*, але й дозволяє встановити особливості ліпідного складу бактерій і відповідно диференціювати їх на грампозитивні та грамнегативні.