

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
физический факультет
кафедра общей физики

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

студентки 605 группы
Мырсиковой Екатерины Викторовны

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОМАРКЕРОВ СЕМЕЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕИНА С АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

Научный руководитель:
кандидат физ.-мат. наук,
стар.преп. Власова И.М.

Допущена к защите
22 декабря 2010 года
Зав.кафедры общей физики
Профессор _____ А.М. Салецкий

Москва-2010

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Применение спектроскопических методов в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)	6
§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	6
§1.2. Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна – Фольмера.....	8
§1.3. Основы спектроскопии комбинационного рассеяния.....	11
§1.4. Наномаркеры семейства флуоресцеина.....	14
§1.5. Применение флуоресцентной спектроскопии и КР – спектроскопии в исследованиях белковых макромолекул.....	17
Глава 2. Методическая часть эксперимента	22
§2.1. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и наномаркеров для изучения констант связывания наномаркеров с белком методом флуоресцентной спектроскопии	22
§2.2. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и наномаркеров для изучения изменений вторичной структуры белка методом КР - спектроскопии	22
§2.3. Методика экспериментов на флуориметре для исследования констант связывания наномаркеров с сывороточным альбумином человека.....	23
§2.4. Методика экспериментов на КР – спектрометре для исследования вторичной структуры сывороточного альбумина человека при связывании им наномаркеров семейства флуоресцеина.....	23
Глава 3. Исследование взаимодействия наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека (описание собственных результатов и их обсуждение)	25

§3.1 Исследование флуоресцентных характеристик наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН.....	25
§3.2 Определение констант химического связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека при различных значениях рН.....	35
§3.3 Исследование изменений вторичной структуры сывороточного альбумина человека при связывании им наномаркеров семейства флуоресцеина при различных значениях рН.....	48
Основные результаты и выводы.....	59
Список цитируемой литературы.....	60

Введение

Использование методов оптики и спектроскопии для исследовательских задач биологических систем является одной из важнейших задач современной физики. В настоящее время оптико-спектральные методы широко применяются для исследования функций и структуры биологических молекул, например, компонентов крови.

Объектом исследования в данной работе является сывороточный альбумин человека. Сывороточный альбумин человека представляет собой глобулярный белок, выполняющий в плазме крови транспортные функции. Многие лекарственные препараты в кровеносном русле связываются с альбумином.

Анализ механизма связывания сывороточного альбумина человека с различными лигандами чрезвычайно интересен с точки зрения биомедицины. При этом широко используются флуоресцентные наномаркеры. Для исследования белков плазмы крови обычно используются анионные наномаркеры (при физиологическом значении pH 7,4) – такие как эозин, флуоресцеин и эритрозин, принадлежащие к одному гомологическому ряду производных флуоресцеина.

Основой взаимодействий молекулы сывороточного альбумина человека с лигандами является структурная подвижность этой белковой молекулы, обеспеченная уникальной петлевой укладкой единственной полипептидной цепи белка из 585 аминокислотных остатков. Вторичная структура сывороточного альбумина человека состоит из α -спиральных участков и участков хаотической укладки: например при физиологическом значении pH около 50 – 67 % аминокислотных остатков уложены в α -спирали. В неспирализованных участках белковая цепь изгибается. Между остатками цистеина в сывороточном альбумине человека образуются 17 дисульфидных связей, которые формируют 9 петель.

В результате гидрофобных взаимодействий каждые три выше указанные петли образуют глобулярную структуру. Такая структурная единица альбумина называется доменом. Молекула сывороточного альбумина человека состоит из 3 практически одинаковых доменов. На сегодняшний день преобладает модель «сердца» третичной структуры альбумина, домены в этой модели расположены под углом друг к другу.

При связывании лигандов в молекуле сывороточного альбумина человека происходят конформационные перестройки, которые могут быть довольно значительными. Конформационные перестройки возможны как во всей молекуле альбумина, так и только в связывающей области.

КР - спектроскопия обширно применяется в биологических и медицинских исследованиях. Именно КР – спектроскопия ближней инфракрасной области позволяет исследовать механизм связывания данных наномаркеров с белком.

Данная работа посвящена исследованию флуоресцентных характеристик наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН. Также в работе определены константы химического связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека при различных значениях рН. Методом КР – спектроскопии в работе исследованы изменения вторичной структуры сывороточного альбумина человека при связывании им наномаркеров семейства флуоресцеина при различных значениях рН.

Результаты исследования спектроскопическими методами связывания наномаркеров с сывороточным альбумином человека при различных значениях рН представляют интерес не только с точки зрения оптико-спектральных методов изучения сложных макромолекулярных систем, но и с точки зрения прикладных биологических задач.

Глава 1. Применение спектроскопических методов в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)

§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в основное, называется люминесценцией. В реальных условиях наблюдается одновременно свечение огромного числа молекул, которые излучают свет независимо друг от друга, давая некогерентное излучение. При этом происходит полное преобразование поглощенной энергии в собственное излучение, что отличает люминесценцию от явлений рассеяния и отражения света. Существует большое количество разнообразных, как органических, так и неорганических веществ, обладающих люминесцентной способностью.

Электронное состояние молекулы характеризуется средним временем жизни τ_n , представляющим среднюю продолжительность нахождения молекулы в данном n-ном состоянии.

Люминесценция - один из широко распространенных в природе видов излучения. Люминесценция возникает в результате поглощения веществом энергии возбуждения и перехода его частиц из основного в возбужденное электронное состояние. Таким образом, люминесценцией является свечение вещества, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в основное. Если возбуждение происходило за счёт поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения в процессе релаксации носит название фотолюминесценции.

Люминесценция подразделяется на два вида (флуоресценцию и фосфоресценцию) в зависимости от характера электронного состояния, из которого молекулы переходят в основное состояние с испусканием электромагнитного излучения [1]. При переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность, наблюдается флуоресценция (рис.1.1.): обычно между синглетным первым возбужденным и основным состояниями $S_1 \rightarrow S_0$. Флуоресценция представляет собой свечение, мгновенно затухающее после прекращения возбуждения ($\sim 10^{-9}$ с).

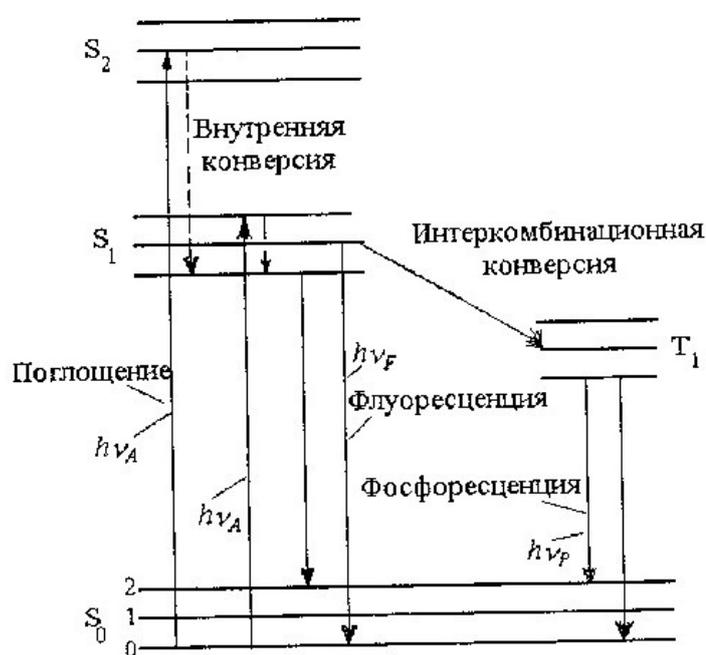


Рис.1.1. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

Интенсивность спектральных полос зависит от вероятностей электронно-колебательных переходов молекул и от числа молекул, заселяющих соответствующий исходный электронно-колебательный уровень. Спектр люминесценции – это функция распределения излучающей веществом энергии по длинам волн или частотам. Каждой полосе

поглощения соответствует полоса флуоресценции. Спектр возбуждения – это функция распределения излучаемой веществом энергии в зависимости от длины (или частоты) возбуждения. В принципе форма спектра возбуждения должна быть идентична с формой спектра поглощения молекул и не зависеть от длины волны, на которой измеряют флуоресценцию. Однако это выполняется очень редко. Дело том, что спектры поглощения и возбуждения могут отличаться из-за различия химических и физических свойств молекул в возбужденном состоянии по сравнению с основным.

Физической константой, характеризующей люминесцентные молекулы, является разница длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции. Эта константа называется стоксовым сдвигом и характеризует долю энергии возбуждения, которая расходуется молекулой в виде тепла за время существования ее возбужденного состояния, предшествующего ее переходу в основное состояние.

§1.2. Тушение флуоресценции. Уравнение Штерна - Фольмера

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. К тушению может проводить множество процессов, в том числе реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов и тушение при столкновениях [2].

Для тушения (и статического, и динамического) требуется контакт между молекулами флуорофора и тушителя. В случае динамического тушения тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения в возбужденном состоянии. В результате контакта флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. В случае статического тушения между флуорофором и тушителем образуется комплекс, который не флуоресцирует. В любом случае, чтобы произошло

тушение, флуорофор и тушитель должны контактировать. Это - основное требование, которое проявляется в различных приложениях тушения.

Изучению тушения благоприятствует то, что многие вещества действуют как тушители флуоресценции.

Множество тушителей пригодно для изучения флуоресценции белков, в особенности при рассмотрении поверхностной доступности триптофановых остатков и проницаемости белков для тушителей.

Эффект тушения зависит от его механизма, обусловленного структурой индивидуальных молекул. Детальный анализ механизма тушения сложен.

Динамическое тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{\text{дин}} [Q] \quad (1)$$

где F_0 и F - интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно; k_q - биомолекулярная константа скорости тушения; τ_0 - время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя; $[Q]$ - концентрация тушителя; $K_{\text{дин}} = k_q \tau_0$ - штерн-фольмеровская константа тушения. Данные по тушению обычно представляют в координатах F_0/F от $[Q]$, поскольку F_0/F , как ожидается, должно линейно зависеть от концентрации тушителя. График дает, отсекаемый отрезок на оси y , равный единице, и наклон, равный $K_{\text{дин}}$. Полезно отметить, что $K_{\text{дин}}^{-1}$ равна концентрации тушителя, при которой $F_0/F = 2$, т.е. тушится 50% интенсивности флуоресценции. Прямолинейная зависимость в координатах Штерна - Фольмера обычно указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя. Если присутствуют два типа флуорофоров и один из них недоступен для тушителя, то штерн-фольмеровский график отклоняется от линейности в сторону оси x . Такой результат часто встречается при тушении флуоресценции триптофана в белках полярными или заряженными тушителями. Эти молекулы с трудом

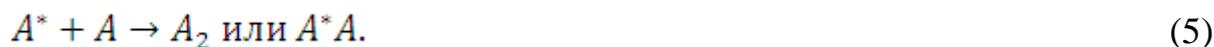
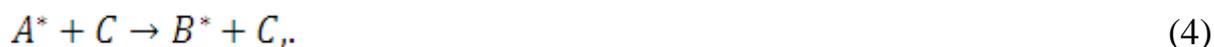
проникают внутрь гидрофобных белков и тушат только остатки триптофана на поверхности белка.

Квантовый выход люминесценции есть отношение числа излученных квантов к числу квантов, поглощенных при стационарном режиме возбуждения [1]. Выражение для квантового выхода флуоресценции записывается в виде:

$$B_{\text{фл}} = k_{\text{фл}} / (k_{\text{фл}} + k_{\text{БК}} + k_{\text{СТ}}) \quad (2)$$

где $k_{\text{фл}}$ – константа скорости флуоресценции, $k_{\text{БК}}$ и $k_{\text{СТ}}$ – константы скорости внутренней и интеркомбинационной конверсии.

Если возбужденные молекулы взаимодействуют с каким-либо веществами, присутствующими в системе, то кинетические схемы запишутся в виде:



В результате процесса (3) взаимодействие возбужденной молекулы A^* с молекулой тушителя C приводит к образованию невозбужденной молекулы B . При этом наблюдается так называемое неадиабатическое тушение люминесценции молекул A . Константа скорости этого процесса k_q . Уравнение (4) описывает адиабатическое тушение, поскольку в результате взаимодействия возбужденной молекулы A^* с тушителем C образуется возбужденная молекула B^* .

Кинетическая система (5) описывает процесс образования димера, который может быть невозбужденным A_2 либо возбужденным эксимером A^*A . В связи с тем, что в этом процессе в качестве тушителя выступает невозбужденная молекула A , в этом случае говорят о концентрационном тушении.

С учетом процессов (3) - (5) выражение для квантового выхода флуоресценции (2) примет следующий вид:

$$B'_{\phi\lambda} = \frac{k_{\phi\lambda}}{k_{\phi\lambda} + k_{BK} + k_{ST} + k_Q[Q]} \quad (6)$$

где [Q]- концентрация молекул тушителя.

$$\frac{B_{\phi\lambda}}{B'_{\phi\lambda}} = 1 + k_Q[Q]/(k_{\phi\lambda} + k_{BK} + k_{ST}) = 1 + K_D[Q] \quad (7)$$

где K_D - константа динамического тушения. Соотношение (7) и есть уравнение Штерна – Фольмера.

§1.3. Основы спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света

В 1928 г. советскими физиками Г.С. Ландсбергом и Л.И. Мандельштамом на кристаллическом кварце и индийском физиком Раманом на жидкости было открыто новое явление в рассеянии света. Кроме основной несмещенной линии (обладающей тонкой структурой) были обнаружены дополнительные линии, которые получили название линией комбинационное рассеяние света. Было показано, что новые линии возникают в результате взаимодействия падающего излучения с молекулами вещества [1]. Ядра молекул колеблются с определенной частотой относительно друг друга. За счет этих видов движения в спектре рассеянного света и появляется линии комбинационного рассеяния света.

Рассеянный свет должен содержать наряду с несмещенной частотой ω (рэлеевская линия) также и излучения, частоты которых смещены на величину $\pm 2 \omega_r t$. В результате в спектре рассеянного света должны появляться суммарные и разностные частоты. При этом если молекула переходит под воздействием падающего излучения на более высокий энергетический уровень, то частоты рассеянного излучения уменьшаются. Эти переходы и соответствующие им длины волн, или частоты, получили название красных, или стоксовых. Наоборот, частота рассеянного излучения увеличивается, если в результате взаимодействия с падающей световой

волной молекула занимает более низкое энергетическое состояние. Такие переходы и соответствующие им длины волн или частоты называются фиолетовыми или антистоксовыми. В результате наблюдаются колебательные спектры комбинационного рассеяния света.

Колебания отдельных атомов в молекуле относительно друг друга называются собственными, а их частоты – собственными частотами внутренних колебаний молекулы. Колебания атомов, значительно более медленные, чем колебания электронов, приводят к изменению поляризуемости молекулы. Возникающий при этом дополнительный индуцированный дипольный момент $\Delta P = \Delta\alpha(r)E(t)$ обуславливает возникновение комбинационного рассеяния света с частотой ν , отличающейся от частоты возбуждающего света ν_0 . Поляризуемость α зависит от расстояния между атомами.

С точки зрения квантовой теории появление сателлитов в спектре рассеянного света может быть объяснено следующим образом. Пусть молекула находится в основном колебательном энергетическом состоянии E_1 . Если величина падающего кванта света $h\nu_0$ больше энергии, соответствующей разнице энергий двух соседних колебательных уровней, то часть ее может пойти на переход молекулы в возбужденное состояние E_2 , другая – рассеется в виде кванта света $h\nu'$. Из закона сохранения энергии следует, что

$$h\nu_0 = h\nu' + (E_2 - E_1),$$

или

$$h\nu_0 = h\nu' + h\nu_{12},$$

откуда

$$\nu_0 = \nu' + \nu_{12}.$$

Следовательно, рассеянный квант будет иметь меньшую частоту по сравнению с падающим квантом и в спектре появится красный (стоксовый) сателлит.

В том случае, если падающий квант света взаимодействует с молекулой, находящейся в возбужденном состоянии с энергией E_2 , она может перейти в основное состояние E_1 с передачей энергии рассеянному кванту света. Это приводит к образованию фиолетового (антистоксового) сателлита с частотой

$$\nu' = \nu_0 + \nu_{12}$$

Чисто колебательных спектров не существует, так как молекулы в основном и возбужденном состояниях распределены по ряду вращательных состояний. Поэтому при рассмотрении колебательных переходов одновременно необходимо учитывать и участие в них вращательных состояний.

Из теории колебательных спектров следует, что число наблюдаемых линий КР указывает на большую или меньшую сложность молекулы. Так, простые молекулы дают всего несколько линий в КР-спектре, в то время как многоатомные молекулы обнаруживают довольно сложные и богатые линиями спектры. Анализ по спектрам КР основывается на том, что молекулы исследуемого вещества имеют свой индивидуальный набор собственных частот. Наиболее просто частоту собственных колебаний можно рассчитать для двухатомной молекулы.

В химии, особенно органической, уже давно и широко вошел в практику структурно-групповой анализ по колебательным спектрам[3]. Он базируется прежде всего на концепции так называемых групповых или характеристических частот, хотя в последнее время все больше внимания обращают также на интенсивности полос.

По определению, каждое нормальное колебание – это колебание всей молекулы в целом, тем не менее некоторые из них могут быть в большей или меньшей степени локализованы на каких-то отдельных связях. При этом оказывается, что для некоторых фрагментов или связей, в каких бы молекулах они ни находились, характерны свои более или менее узкие интервалы групповых частот, а нередко и относительные интенсивности

полос. Так, например, при наличии в молекуле карбонильной группы в КР спектре всегда наблюдается очень сильная полоса в области $\sim 1700 \text{ см}^{-1}$. В общем случае для всего множества классов соединений, содержащих эту группу, интервал частот колебаний группы C=O весьма широк, но при рассмотрении отдельных классов соединений с учетом окружения данной группы характерные для них интервалы частот ν (C=O) сильно сужаются.

Иногда для идентификации соединений или, по крайней мере, какого-то фрагмента определенного строения, или типа замещения используют не только характерные полосы, но целые участки спектра, имеющие характерный вид с учетом всех полос и распределения интенсивности в данной области. Это может относиться как к фундаментальным частотам, так и к обертонам и составным частотам. Например, при различных типах замещения бензольного кольца внеплоскостные колебания незамещенных атомов водорода дают весьма характерные наборы основных частот $\sim 700\text{-}900 \text{ см}^{-1}$, а в области $1650\text{-}2000 \text{ см}^{-1}$ наблюдаются очень характерные сочетания полос КР спектров, обусловленные обертонами и составными частотами. По таким спектрам достаточно надежно определяется тип замещения бензольного кольца.

§1.4. Наномаркеры семейства флуоресцеина

Для исследования белков плазмы крови обычно используются анионные наномаркеры при физиологическом значении pH 7,4 – такие как эозин, флуоресцеин и эритрозин, принадлежащие к одному гомологичному ряду производных флуоресцеина [4].

Как известно, pK карбоксильной группы флуоресцеина 8,0 и pK гидроксильной группы флуоресцеина 6,8 (рис. 1.2.). В области pH, меньших 5,5, флуоресцеин слабо положительно заряжен. В области pH 5,5 – 6,8 молекулы флуоресцеина электрически нейтральны. В области pH 6,8 – 8,0 молекулы флуоресцеина слабо отрицательно заряжены (моноанионы). В

области рН, больших 8,0, флуоресцеин сильно отрицательно заряжен (дианион).

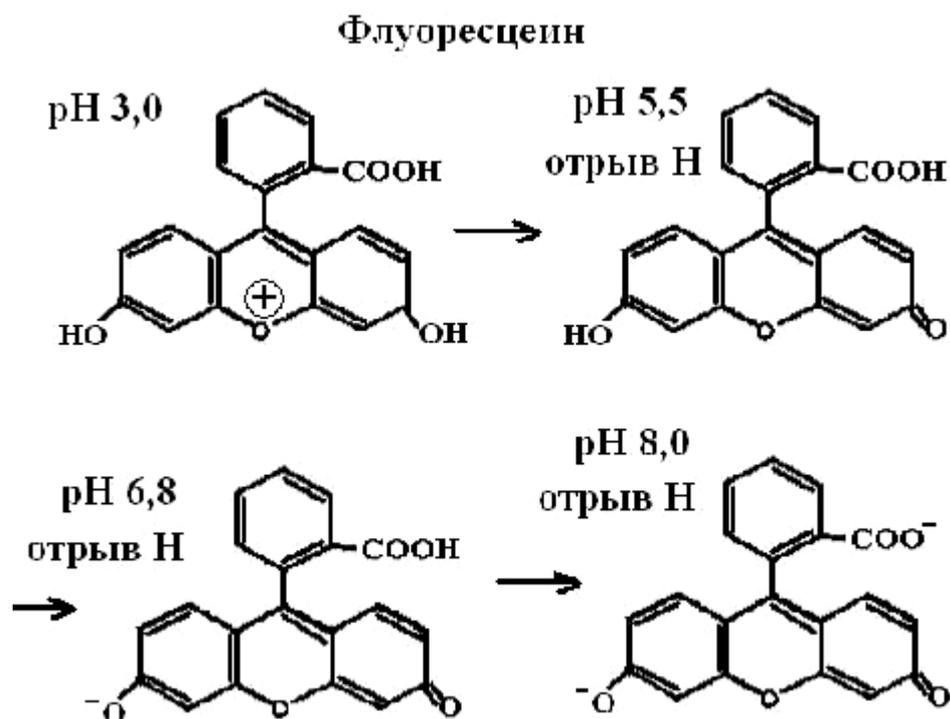


Рис.1.2. Структурная формула флуоресцеина и значения его рК.

рК карбоксильной группы эозина 5,0 и рК гидроксильной группы эозина 3,0 (рис. 1.3.). В области рН, меньших 3,0, молекулы эозина электрически нейтральны. В области рН 3,0 – 5,0 молекулы эозина слабо отрицательно заряжены (моноанионы). В области рН, больших 5,0, молекулы эозина сильно отрицательно заряжены (дианионы).

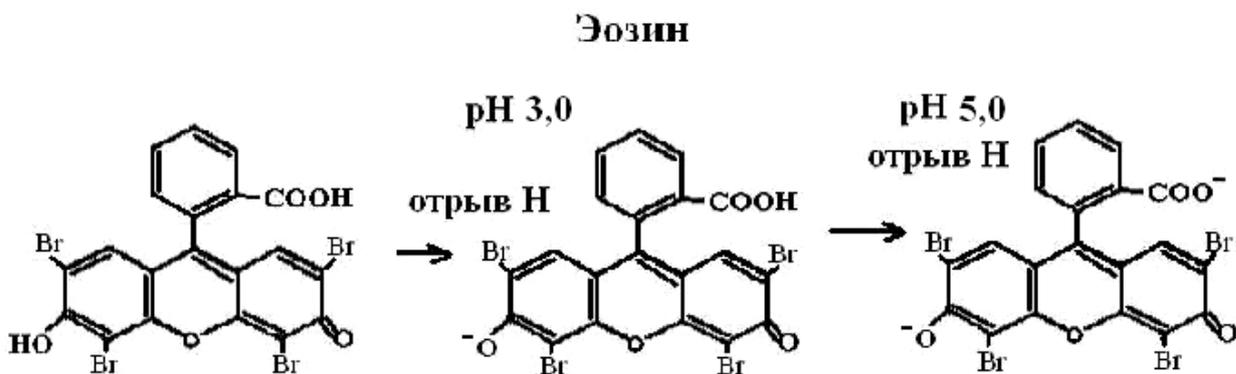


Рис. 1.3. Структурная формула эозина и значения его рК.

У эритрозина следующие значения рК ионизируемых групп: рК карбоксильной группы эритрозина 5,5 и рК гидроксильной группы эритрозина 3,6 (рис. 1.4.). В области рН, меньших 3,6, молекулы эритрозина электрически нейтральны. В области рН 3,6 – 5,5 молекулы эритрозина слабо отрицательно заряжены (моноанионы). В области рН, больших 5,5, молекулы эритрозина сильно отрицательно заряжены (дианионы).

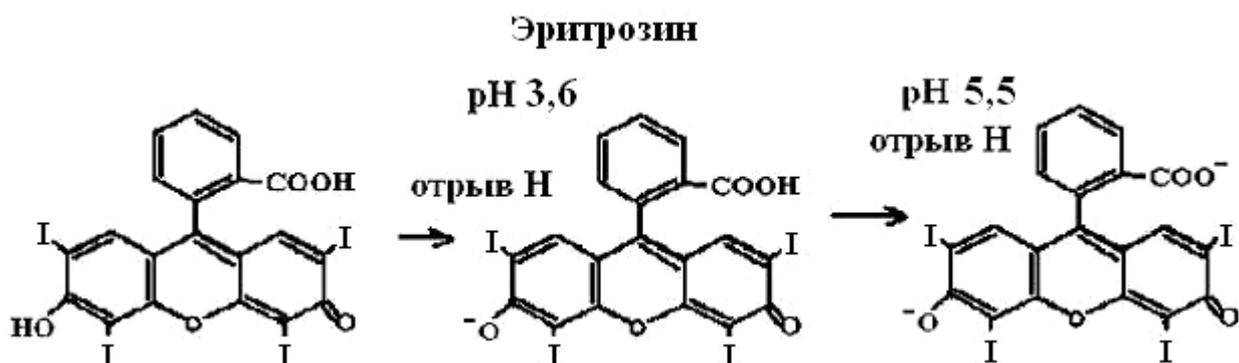


Рис. 1.4. Структурная формула эритрозина и значения его рК.

Эозин является бромированной производной флуоресцеина, а эритрозин является йодированной производной флуоресцеина. Увеличение электроотрицательности наблюдается в следующем направлении: водород (у флуоресцеина) – йод (у эритрозина) – бром (у эозина). Следовательно, введение в молекулу флуоресцеина более электроотрицательных атомов (чем водород) уменьшает значения рК ионизируемых групп, а следовательно и изменяет флуоресцентно – спектральные характеристики зондов.

	рК (ОН)	рК (COOH)
Флуоресцеин	6,8	8,0
Эритрозин	3,6	5,5
Эозин	3,0	5,0

§1.5. Применение флуоресцентной спектроскопии и КР - спектроскопии в исследованиях белковых макромолекул

В работе [5] методом КР – спектроскопии проведен сравнительный анализ связывания с сывороточным альбумином человека трёх молекулярных флуоресцентных зондов (флуоресцеина, эозина и эритрозина), принадлежащих к одному гомологичному ряду. Показано присоединение всех трёх зондов к связывающему центру I альбумина. Характер связывания исходного зонда данного ряда (флуоресцеина) с белком отличается от характера связывания его галоген-производных (эозина и эритрозина) с белком. Отличия в связывании этих трёх зондов с альбумином определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов в структурных формулах зондов и, следовательно, величиной рК их ионизируемых групп.

В работе [6] методом спектроскопии комбинационного рассеяния света изучен механизм связывания молекулярного зонда эозина с молекулами сывороточного альбумина человека. Определено положение связывающего центра на молекуле альбумина для эозина. Установлены аминокислотные остатки молекулы альбумина, участвующие в связывании эозина.

В работе [7] методом спектроскопии комбинационного рассеяния света изучен механизм связывания молекулярного зонда флуоресцеина с молекулами сывороточного альбумина человека. Определено положение связывающего центра на молекуле альбумина для флуоресцеина. Установлены аминокислотные остатки молекулы альбумина, участвующие в связывании флуоресцеина при различных значениях рН раствора. Зарегистрированы конформационные перестройки в глобулах сывороточного альбумина человека при связывании флуоресцеина при различных рН.

В работе [8] проведен анализ спектрально – люминесцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации в растворах сывороточного альбумина человека при различных рН трех флуоресцентных

зондов (эозин, эритрозин и флуоресцеина). Общими чертами для всех зондов при добавлении в раствор белка являются: тушение и красный сдвиг максимума флуоресценции. При этом между флуоресцеином и его галогенпроизводными (эозином и эритрозином) наблюдаются отличия в рН – зависимостях флуоресценции, степени ассоциации и угла между дипольными моментами молекул зонда, образующих димеры.

Собственная триптофановая флуоресценция белков в настоящее время широко исследуется. Например, в работе [9] представлены исследования тушения собственной триптофаной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина под действием алкилпиридиновых катионов. В работе показано, что тушение собственной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина зависит от длины алкильной цепи алкилпиридиновых катионов. По полученным спектрам собственной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в присутствии алкилпиридиновых катионов рассчитана константа ассоциации белка с данными катионами [9].

В работе [10] представлены исследования красителя эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина. Показано, что флуоресценция эозина при связывании его с белком тушится. По полученным спектрам флуоресценции эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина рассчитаны константы связывания эозина с белком. В [10] показана возможность использования эозина в качестве флуоресцентного маркера в исследованиях белковых молекул.

В [11] исследован механизм взаимодействия бычьего сывороточного альбумина с красителем бенгальским розовым. Анализ спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах БСА указывает на динамическое и статистическое взаимодействие с белком. Определен радиус переноса энергии электронного возбуждения по Ферстеру между РБ и БСА.

В [12] рассмотрен новый флуоресцентный метод, который был разработан для микрограммовых эквивалентов БСА, основанный на флуоресценции Нильского Синего на 670 нм, вызванной связыванием

Нильского Синего с БСА. Константа связывания микромолярного комплекса НС – БСА оценена методом Скэтчарда.

В работе [13] исследовано связывание БСА и нового зонда – ФА, который обладает очень характерным спектром флуоресценции. Две области поглощения и две области флуоресценции ФА очень чувствительны к нековалентным взаимодействиям в окружении зонда. Анализ этой спектроскопической информации позволяет заключить, что участки связывания характеризуют очень низкую полярность, высокую степень экранировки от водной среды и необычно высокую электронную поляризуемость. Последнее предполагает близкое расположение зонда ФА к ароматическим аминокислотным остаткам в участках связывания. Новый зонд может быть предложен для изучения взаимодействия лигандов и красителей различной природы с сывороточным альбумином.

Работа [14] посвящена исследованию флуоресценции белка, возможной при его нг-уровне. Лиганд Шиффа с донорно – акцепторным заменителем был использован в качестве флуоресцентного зонда. В работе продемонстрировано, что флуоресцентные характеристики зонда могут быть использованы для оценки даже нг-уровней белка.

В [15] обнаружены отличия в растворах сывороточного альбумина человека у зондов семейства флуоресцеина в молекулярной ассоциации, в характере зависимости флуоресценции от рН и в анизотропии флуоресценции, которые определяются электроотрицательностью атомов боковых радикалов в структурных формулах и значениями рК ионизируемых групп зондов.

В работе [16] процесс сворачивания и самоассоциации при самосборке нативной структуры апобелка был изучен при одновременном измерении эффективности переноса энергии, анизотропии, интегральной интенсивности флуоресценции и степени доступности флуоресцеиновых хромофоров для анионов тушителя Г. Выбранная донор-акцепторная пара дансил-флуоресцеин часто используется при измерении переноса энергии. Был

обнаружен эффективный перенос энергии в растворе между дансил- и флуоресцеин-мечеными молекулами апобелка при низких ($<0,6$ мкМ) концентрациях апоЕ, когда перенос за счет диффузии отсутствует, и регистрируемый процесс может отражать лишь самоассоциацию.

В [17] методами абсорбционной и люминесцентной спектроскопии исследованы процессы взаимодействия полярного и неполярного люминесцентных зондов с альбуминами сыворотки крови человека. Установлено, что зонды – полярный эозин и неполярный антрацен – эффективно связываются с белками. Определены радиусы сферы тушения триплетных состояний донора энергии – эозина при добавлении акцептора – антрацена, в процессе триплет-триплетного переноса энергии электронного возбуждения в белках для однородного и неоднородного распределения молекул акцептора по объему раствора. Показано, что уменьшение радиуса сферы тушения при добавлении поверхностно-активного вещества – додецилсульфата натрия обусловлено структурными изменениями белка.

В работе [18] были исследованы спектры флуоресценции молекул эозина, находящегося в растворе сывороточного альбумина человека (САЧ). Была получена информация о динамике белковых конформационных перестроек при денатурации белка под воздействием додецилсульфата натрия (ДСН) для различных значений рН раствора. Выдвинуты предположения о двустадийном характере денатурации САЧ в присутствии ДСН: первая стадия - разрыхление белковых глобул, вторая стадия – полное разворачивание молекул белка. Показано, что при рН раствора, меньших изоэлектрической точки альбумина, денатурация белка в присутствии ДСН происходит обе стадии, а при рН раствора больших изоэлектрической точки альбумина, останавливается на первой стадии.

Работа [19] посвящена исследованию флуоресценции молекулярного зонда эозина в растворах сывороточного альбумина человека с неорганическими лигандом (CsCl) и с органическим лигандом ДСН. Проведен анализ взаимодействия белковых макромолекул САЧ с этими

лигандами. Показано, что присутствие низкомолекулярной соли CsCl в растворах изменяет эффективность комплексообразования эозина с САЧ. Получена информация о динамике белковых конформационных перестроек при денатурации под воздействием ДСН.

В работе [20] исследовано влияние денатурации сывороточного альбумина человека под действием поверхностно-активных веществ (додецилсульфата натрия) на фосфоресценцию люминесцентного зонда – эозина. Установлены различия зависимостей интенсивности фосфоресценции эозина от концентрации додецилсульфата натрия при разных рН раствора САЧ. Показано, что при концентрациях додецилсульфата натрия менее критической концентрации мицеллообразования проявляется влияние гидрофобных взаимодействий эозина с белком на процессы дезактивации триплетных состояний эозина.

Глава 2. Методическая часть эксперимента

§2.1. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и наномаркеров для изучения констант связывания наномаркеров с белком методом флуоресцентной спектроскопии

Для определения констант связывания наномаркеров с сывороточным альбумином человека методом флуоресцентного анализа были приготовлены следующие буферные растворы: 1) 0,1 М CH_3COOH – 0,1 М KOH , pH 3,0÷5,0; 2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH , pH 6,0÷8,0.

На их основе были приготовлены растворы наномаркера (3 мкМ флуоресцеина или 30 мкМ эритрозина или 30 мкМ эозина), содержащие сывороточный альбумин человека (0 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ), при различных значениях pH (3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0).

§2.2. Приготовление растворов сывороточного альбумина человека и наномаркеров для изучения изменений вторичной структуры белка методом КР - спектроскопии

Для изучения структуры сывороточного альбумина человека при связывании с наномаркером (эозином / флуоресцеином / эритрозином) получены КР – спектры следующих растворов:

1. буферных растворов (pH 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) без белка и без наномаркера.
2. буферных растворов (pH 3,5–8,0) с добавлением наномаркера (30 мкМ эозин, 5 мкМ флуоресцеин, 5 мкМ эритрозин), но без белка.
3. буферных растворов (pH 3,5–8,0) с добавлением альбумина (10 мг/мл = 150 мкМ), но без наномаркера.

4. буферных растворов (рН 3,5–8,0), содержащих как наномаркер (мкМ эозин, 5 мкМ флуоресцеин, 5 мкМ эритрозин), так и альбумин (10 мг/мл).

§2.3. Методика экспериментов на флуориметре для исследования констант связывания наномаркеров с сывороточным альбумином человека

Исследования констант связывания наномаркеров (эозина, эритрозина и флуоресцеина) с сывороточным альбумином человека проводились с помощью спектрометра LS 55 (Perkin Elmer).

Спектры флуоресценции наномаркеров снимались с различными концентрациями белка (0 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ).

Флуоресценция эозина, как в растворах с альбумином, так и в растворах без альбумина возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 520$ нм. Флуоресценция эозина регистрировалась в диапазоне 530 – 700 нм.

Флуоресценция флуоресцеина, как в растворах с альбумином, так и в растворах без альбумина возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 440$ нм. Флуоресценция флуоресцеина регистрировалась в диапазоне 450 – 700 нм.

Флуоресценция эритрозина, как в растворах с альбумином, так и в растворах без альбумина возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 530$ нм. Флуоресценция эритрозина регистрировалась в диапазоне 540 – 700 нм.

Образцы помещались при измерении в кювету при комнатной температуре. Полученные спектры флуоресценции обрабатывались программой FL Winlab (Perkin Elmer).

§2.4. Методика экспериментов на КР – спектрометре для исследования вторичной структуры сывороточного альбумина человека при связывании им наномаркеров семейства флуоресцеина

Исследования вторичной структуры сывороточного альбумина человека при связывании с наномаркером (флуоресцеином / эозином / эритрозином) выполнены с помощью КР-установки EQUINOX 55 (Bruker) с приставкой FRA-106S (спектроскопия комбинационного рассеяния света ближней инфракрасной области с Фурье – преобразованием), оборудованной InGaAs детектором, длина волны возбуждающего света 1064 нм (Nd-YAG лазер).

Мощность возбуждающего лазера составляла 450 мВт, измерения одного образца продолжались порядка 100 сканов (6 мин).

Охватываемый спектральный диапазон составлял 400-3000 см⁻¹, разрешение КР – спектра составляло 2 см⁻¹.

КР – спектры обрабатывались программой OPUS 4.2 (Bruker).

Глава 3. Исследование взаимодействия наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека (описание собственных результатов и их обсуждение)

§3.1 Исследование флуоресцентных характеристик наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН

В ходе исследований получены спектры флуоресценции эозина, как в растворах без белка, так и в растворах сывороточного альбумина человека, при различных значениях рН.

На рис. 3.1 представлены зависимости величины интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина в буферных растворах без белка и в буферных растворах с сывороточным альбумином человека от значения рН. Видно, что при комплексообразовании эозина с молекулами белка флуоресценция эозина тушится.

В растворах без белка интенсивность в максимуме спектра флуоресценции эозина уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением рН. Это объясняется тем, что при рН, больших 5,0 (рК карбоксильной группы эозина), молекулы эозина заряжены сильно отрицательно (дианионы), что вызывает их экранировку дипольными молекулами воды. При рН, меньших 5,0, но больших 3,0, молекулы эозина слабо отрицательно заряжены (моноанионы), поэтому экранировка дипольными молекулами воды практически отсутствует.

При связывании эозина с белком длина волны максимума спектра флуоресценции эозина смещается в более красноволновую область (например, при рН 5,0 в растворах без белка $\lambda_{фл}^{max} = 544$ нм; в растворах с

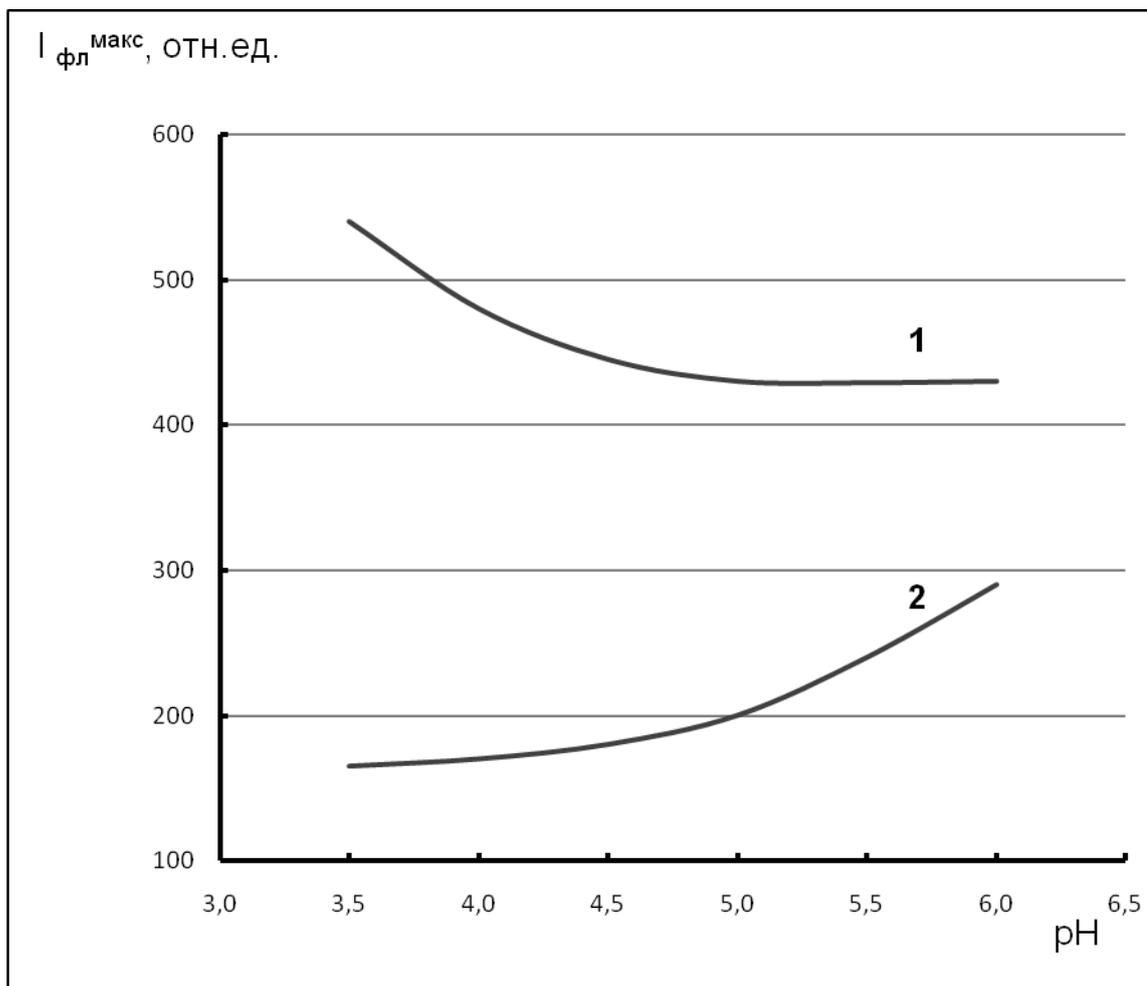


Рис. 3.1. Величина интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина (30 мкМ) в буферных растворах без белка (1) и в буферных растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2). Возбуждение флуоресценции эозина – 520 нм.

белком $\lambda_{\text{фл}}^{\text{max}} = 560$ нм), что объясняется изменением окружения молекул эозина. При увеличении рН интенсивность в максимуме спектра флуоресценции эозина, находящегося в растворах с белком, возрастает, что объясняется электростатическим механизмом взаимодействия эозина с белком. Молекулы эозина, который является анионным красителем в выбранном диапазоне рН, заряжены отрицательно (в области рН 3,0 – 5,0 эозин находится в форме моноаниона; в области рН, больших 5,0, эозин находится в форме дианиона). Молекулы белка при значениях рН, лежащих ниже изоэлектрической точки белка (рI 4,7), заряжены положительно. При значениях рН, лежащих выше рI, молекулы белка в целом заряжены отрицательно, но какие-то участки белка всё равно имеют положительный знак заряда, именно с ними и происходит связывание эозина. Так как по мере увеличения рН положительно заряженных участков на белке все меньше, то и молекулы отрицательно заряженного наномаркера все хуже связываются с белком. При увеличении рН эозин меньше связывается с белком, и его флуоресценция в растворах с белком меньше тушится.

В ходе исследований получены спектры флуоресценции флуоресцеина в растворах без белка и в растворах, содержащих сывороточный альбумин человека, при различных значениях рН.

В растворах с белком максимум спектра флуоресценции флуоресцеина смещается в красную область: например, при рН 5,0 в растворах без белка максимум на 510 нм, а с белком – на 515 нм.

На рис. 3.2 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции флуоресцеина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека.

В растворах без белка при увеличении рН наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции флуоресцеина, что объясняется увеличением отрицательного заряда флуоресцеина. Отрицательно заряженные формы флуоресцеина обладают большой интенсивностью флуоресценции.

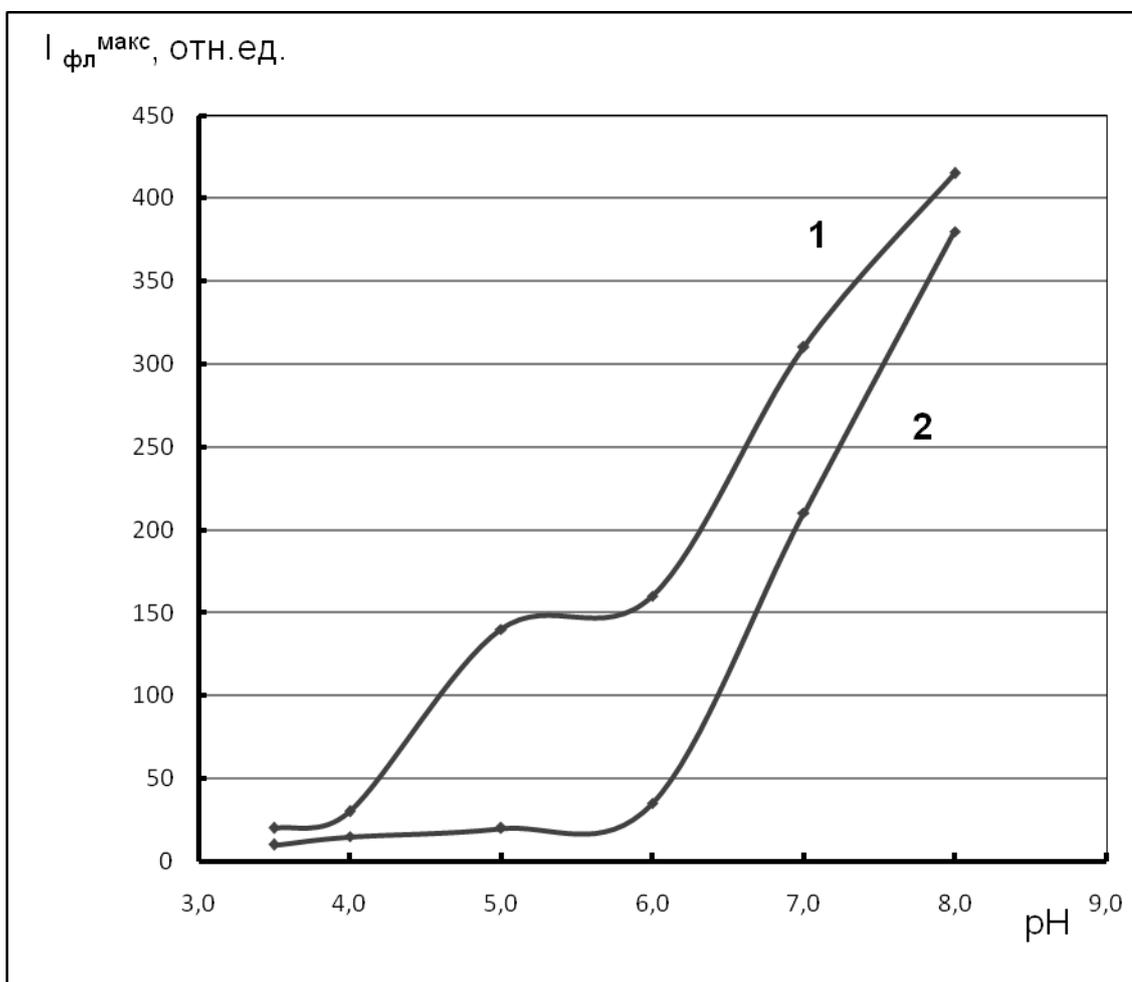


Рис. 3.2. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм) флуоресцеина (3 мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

При связывании флуоресцеина с молекулами сывороточного альбумина человека флуоресценция флуоресцеина тушится (рис. 3.2): интенсивность в максимуме спектра флуоресценции свободного флуоресцеина больше интенсивности в максимуме спектра флуоресценции флуоресцеина в растворах с белком при соответствующих значениях рН.

По тушению флуоресценции флуоресцеина видно, что наибольшее связывание флуоресцеина с белком происходит при рН 5,0 – 6,0, т.е. в той области, где молекулы флуоресцеина электрически нейтральны, а белок слабо отрицательно заряжен. Меньшее связывание наномаркера с белком наблюдается при рН 7,0 – 8,0. Самое слабое связывание наномаркера с белком имеет место при рН 3,5 – 4,0.

В ходе исследований получены спектры флуоресценции эритрозина в растворах без белка и в растворах, содержащих сывороточный альбумин человека, при различных значениях рН. В растворах с альбумином максимум спектра флуоресценции эритрозина смещается в красную область: например, при рН 5,0 максимум в растворах без белка – на 550 нм, а с белком – на 566 нм.

На рис. 3.3 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эритрозина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека.

В растворах без белка при увеличении рН от 3,5 до 5,5 наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции эритрозина, а при увеличении рН от 5,5 и выше интенсивность флуоресценции не меняется.

Уменьшение интенсивности флуоресценции с ростом рН в области 3,5 – 5,5 объясняется увеличением отрицательного заряда эритрозина и увеличением дипольной экранировки молекулами воды. При значениях рН выше 5,5 заряд молекул эритрозина больше не меняется (они находятся в дианионной форме), поэтому дальнейшего тушения флуоресценции молекулами воды не наблюдается, и в области рН выше 5,5 интенсивность флуоресценции эритрозина сохраняет примерно постоянное значение.

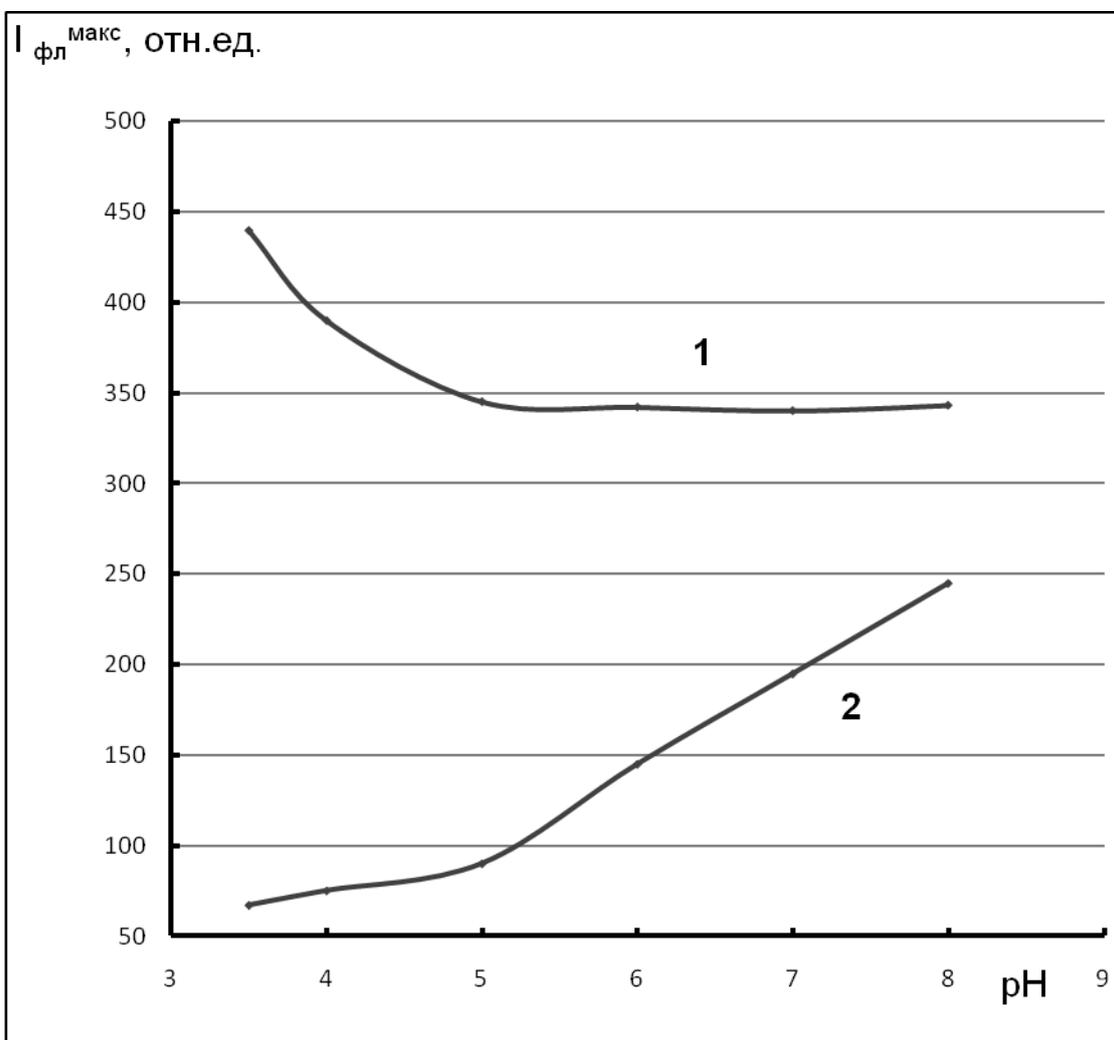


Рис. 3.3. Зависимость интенсивности в максимуме спектра флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм) эритрозина (30 мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

При связывании наномаркера эритрозина с молекулами сывороточного альбумина человека флуоресценция эритрозина тушится (рис. 3.3): интенсивность в максимуме спектра флуоресценции свободного эритрозина больше интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эритрозина в растворах с белком при соответствующих значениях рН.

По тушению флуоресценции эритрозина видно (рис. 3.3), что наибольшее связывание эритрозина с белком происходит в области рН меньших 5,0, что объясняется электростатическими причинами. В этой области значений рН белок в целом положительно заряжен, а эритрозин или находится в нейтральной форме (при рН, меньших 3,6) или находится в слабо отрицательно заряженной форме моноаниона (при рН 3,6 – 5,0), поэтому происходит эффективное связывание эритрозина с белком.

В области значений рН, больших 5,0, происходит незначительное тушение флуоресценции эритрозина в растворах сывороточного альбумина человека по сравнению с флуоресценцией эритрозина в растворах без белка, что указывает на слабое взаимодействие эритрозина с белком при этих значениях рН. Действительно, при рН, больших 5,0, белок в целом заряжен отрицательно, и эритрозин также заряжен отрицательно (в области рН 5,0 – 5,5 эритрозин находится в форме моноаниона, а в области значений рН, больших 5,5, эритрозин находится в форме дианиона).

В ходе работы также были определены значения квантового выхода флуоресценции для всех трех наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеина, эозина и эритрозина).

Квантовый выход флуоресценции наномаркеров определялся относительным методом. В качестве эталонного вещества в работе был использован родамин 6 Ж.

На рис.3.4. представлены зависимости квантового выхода флуоресценции флуоресцеина от рН в растворах без белка и в растворах, содержащих белок. Вид зависимостей повторяет характер зависимости

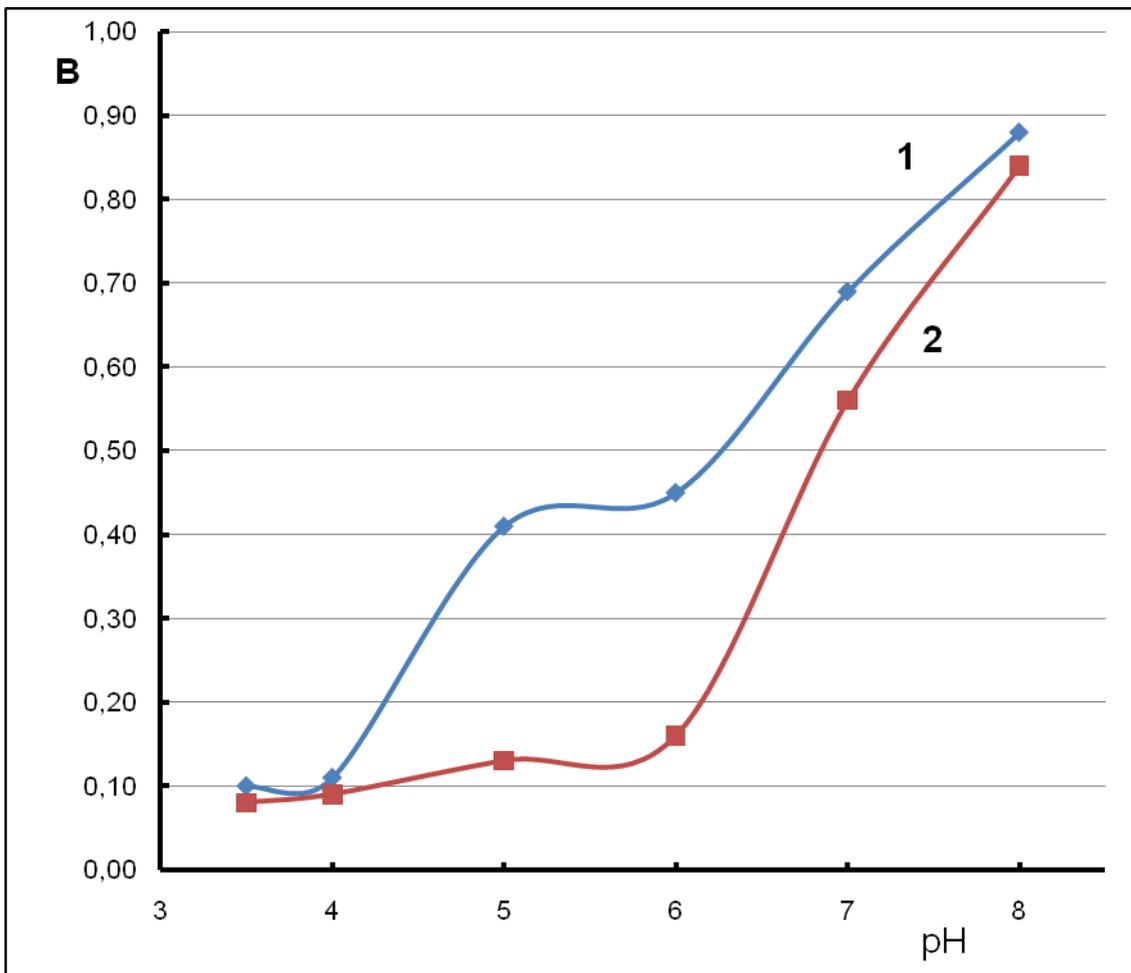


Рис. 3.4. Зависимость квантового выхода флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}=440\text{nm}$) флуоресцеина (3мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в буферных растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

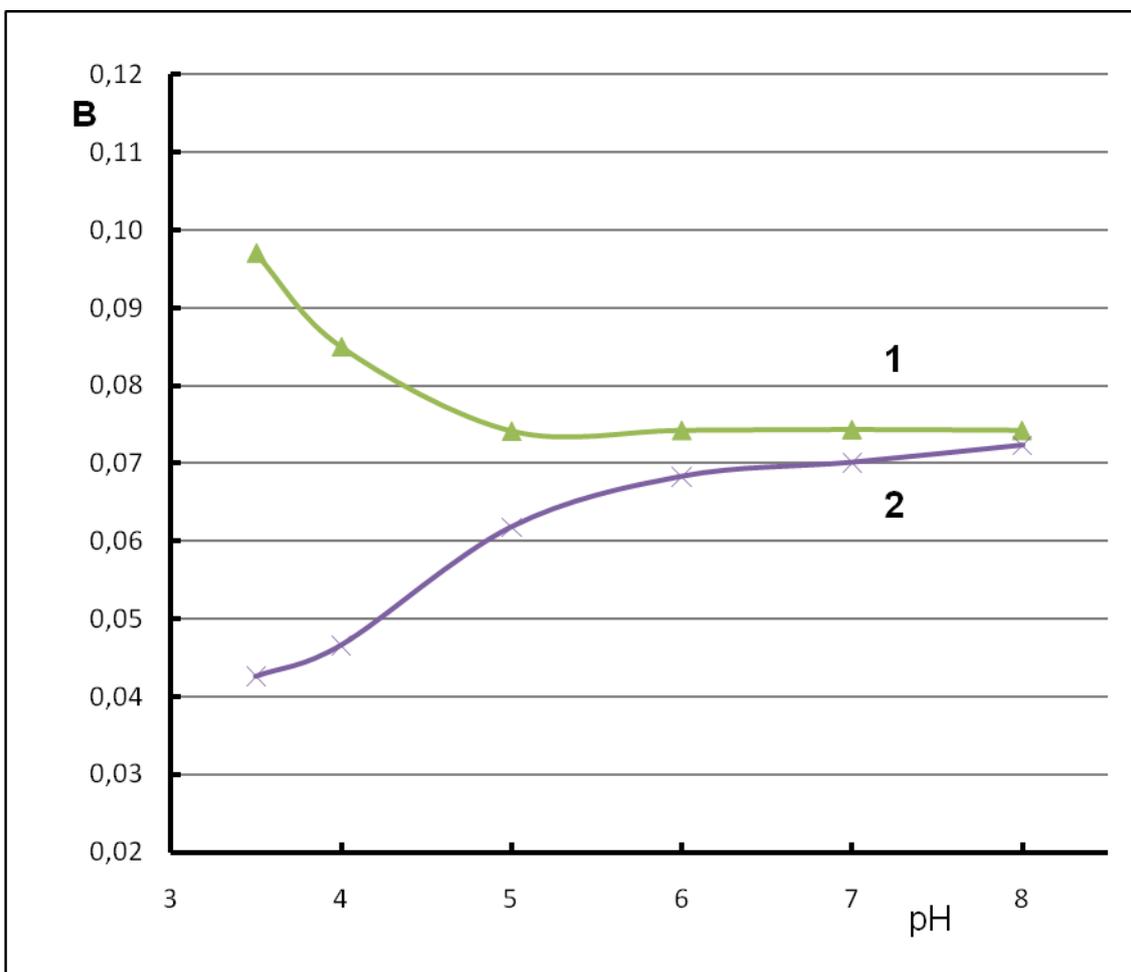


Рис. 3.5. Зависимость квантового выхода флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}=520$ нм) эозина (3мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в буферных растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

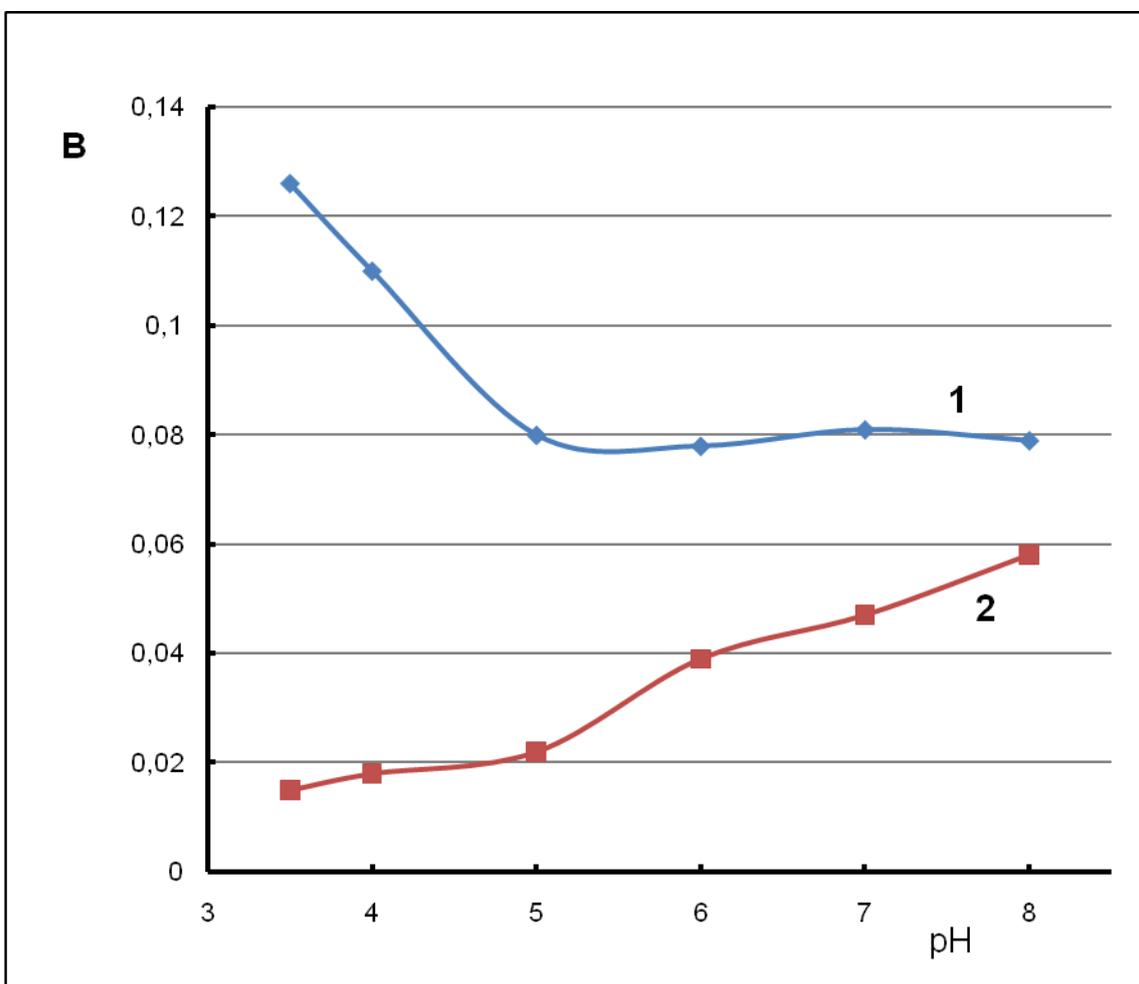


Рис. 3.6. Зависимость квантового выхода флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}=530$ нм) эритрозина (3 мкМ) от рН в растворах без белка (1) и в буферных растворах с сывороточным альбумином человека (150 мкМ) (2).

интенсивности в максимуме спектра флуоресценции флуоресцеина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека. В растворах без белка при увеличении рН наблюдается увеличение значения квантового выхода флуоресценции флуоресцеина. В растворах с белком значение квантового выхода уменьшается. Значение квантового выхода флуоресценции свободного флуоресцеина больше значения квантового выхода флуоресценции флуоресцеина в растворах с белком при соответствующих значениях рН.

На рис.3.5. и рис.3.6 представлены зависимости значения квантового выхода флуоресценции эозина и эритрозина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека. Вид зависимостей повторяет характер зависимости интенсивности в максимуме спектра флуоресценции эозина и эритрозина от рН в растворах без белка и в растворах с сывороточным альбумином человека. Значение квантового выхода флуоресценции свободного эозина и эритрозина больше значения квантового выхода флуоресценции эозина и эритрозина в растворах с белком при соответствующих значениях рН.

§3.2 Определение констант химического связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека при различных значениях рН

Для определения констант связывания наномаркеров с сывороточным альбумином человека по теории Штерна - Фольмера были исследованы спектры флуоресценции наномаркеров в растворах с различными концентрациями белка при различных значениях рН.

В качестве примера, на рис. 3.7 представлены спектры флуоресценции эозина (возбуждение 520 нм) в растворах с различными концентрациями сывороточного альбумина человека при рН 3,5.

На рис. 3.8 представлены спектры флуоресценции флуоресцеина в растворах с различными концентрациями альбумина при рН 6,0.

На рис 3.9 представлены спектры флуоресценции эритрозина в растворах с различными концентрациями альбумина при рН 3,5.

Видно, что при увеличении концентрации белка происходит соответствующее тушение флуоресценции всех трех зондов.

В качестве характеристик связывания флуоресцентных наномаркеров с макромолекулами белка рассматриваются два параметра – константа связывания наномаркера с белком (K) и число центров связывания на белке для данного наномаркера (N). Оба параметра определяются из спектров флуоресценции по теории Скэтчарда. Наномаркеры семейства флуоресцеина связываются со связывающим центром I сывороточного альбумина человека, поэтому в данном случае число центров связывания на белке для этих наномаркеров равно 1 ($N=1$).

Тогда для равновесного случая $Q + F \rightleftharpoons Q - F$, описывающего макромолекулу белка Q с единственным местом связывания наномаркера F можно записать константу связывания наномаркера с белком следующим образом:

$$K = \frac{[Q - F]}{[Q] \cdot [F]}, \text{ где}$$

$[Q - F]$ – концентрация связывания с белком наномаркера F ,

$[F]$ – концентрация не связавшегося с белком наномаркера F ,

$[Q - F] + [Q]$ – общая концентрация белка Q ,

$[F_0] = [Q - F] + [F]$ - общая концентрация наномаркера F в растворе.

Теория Скэтчарда в применении к спектрам флуоресценции наномаркеров, тушащихся при связывании с белком, описывается уравнением Штерна – Фольмера.

Если связанная с белком форма наномаркера не флуоресцирует, то доля оставшейся флуоресценции (F/F_0) определяется той частью от общего количества наномаркера, которая свободна и не связана с белком (f), т.е.

$f = [F]/[F_0]$. Учитывая общую концентрацию наномаркера в растворе $[F_0]$ можно записать константу связывания наномаркера с белком в следующем виде:

$$K = \frac{[Q] - [F]}{[Q] \cdot [F]} = \frac{[F_0] - [F]}{[F] \cdot [Q]} = \frac{[F_0]}{[F] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]} = \frac{1}{[Q]} \cdot \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right).$$

Таким образом, при тушении флуоресценции наномаркера в растворах добавлением различных концентраций тушителя – белка можно записать:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [Q], \text{ где}$$

F_0 - интенсивность флуоресценции наномаркера в отсутствие тушителя (белка), F – интенсивность флуоресценции наномаркера в присутствии тушителя (белка), $[Q]$ – концентрация тушителя (белка), K – эффективная константа связывания наномаркера с белком (M^{-1}). График зависимости $[F]/[F_0] - 1$ от $[Q]$ представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания наномаркера с белком, а при наличии нескольких механизмов связывания наномаркера с белком наблюдается некоторые отклонения от линейности.

По полученным спектрам флуоресценции соответствующего наномаркера (флуоресцеина, эозина и эритрозина) в растворах с различными концентрациями сывороточного альбумина человека при различных значениях рН построены зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$, где F_0 - интенсивность флуоресценции соответствующего наномаркера в отсутствии белка, F – интенсивность флуоресценции соответствующего наномаркера в присутствии белка, $[Q]$ – концентрация сывороточного альбумина человека.

На рис. 3.10. в качестве примера, представлено тушение флуоресценции флуоресцеина добавлением различных концентраций

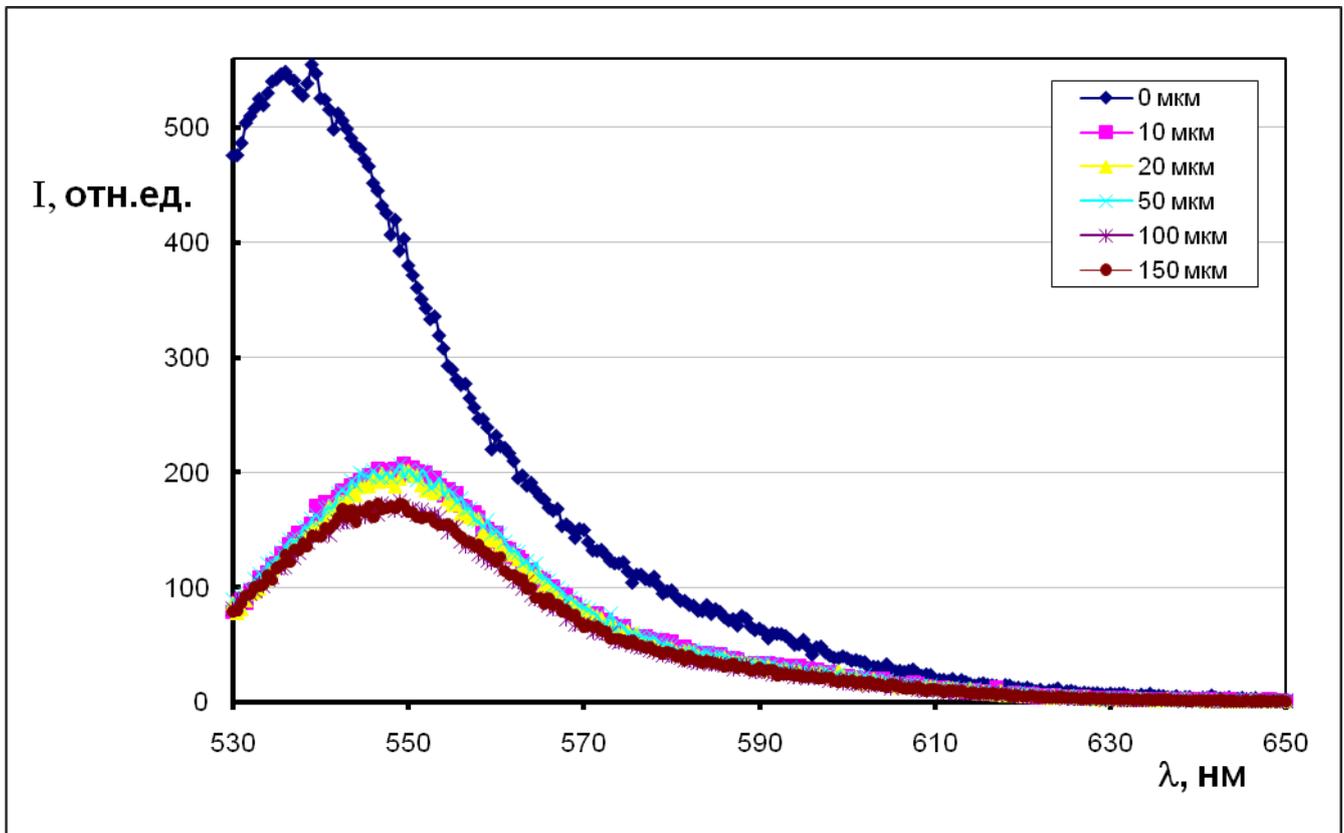


Рис. 3.7. Спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 520$ нм) эозина (30 мкМ) в растворах (рН 3,5) с различными концентрациями сывороточного альбумина человека: 0 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ.

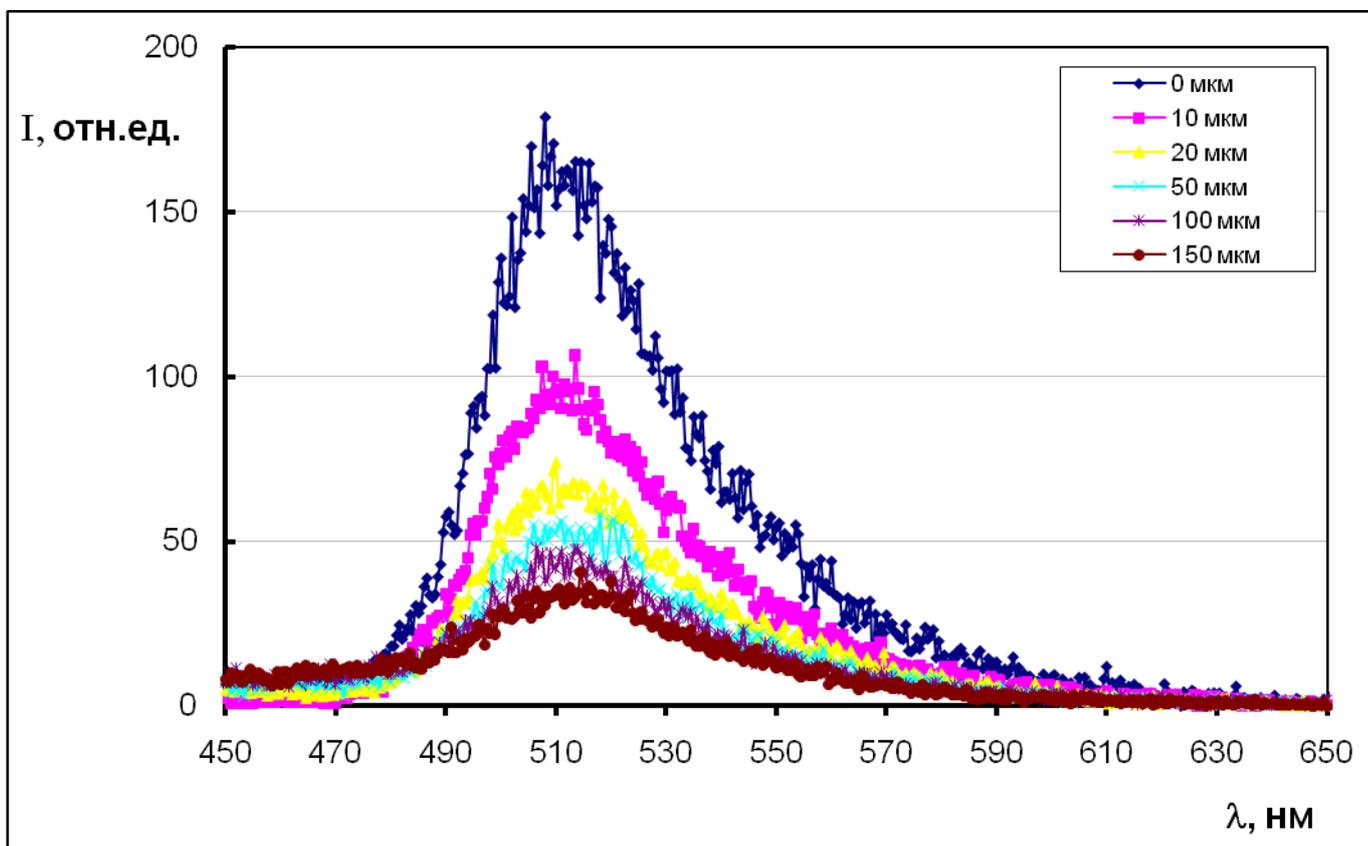


Рис. 3.8. Спектры флуоресценции ($\lambda_{возб}=440$ нм) флуоресцеина (3 мкМ) в растворах (рН 6,0) с различными концентрациями сывороточного альбумина человека: 0 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ.

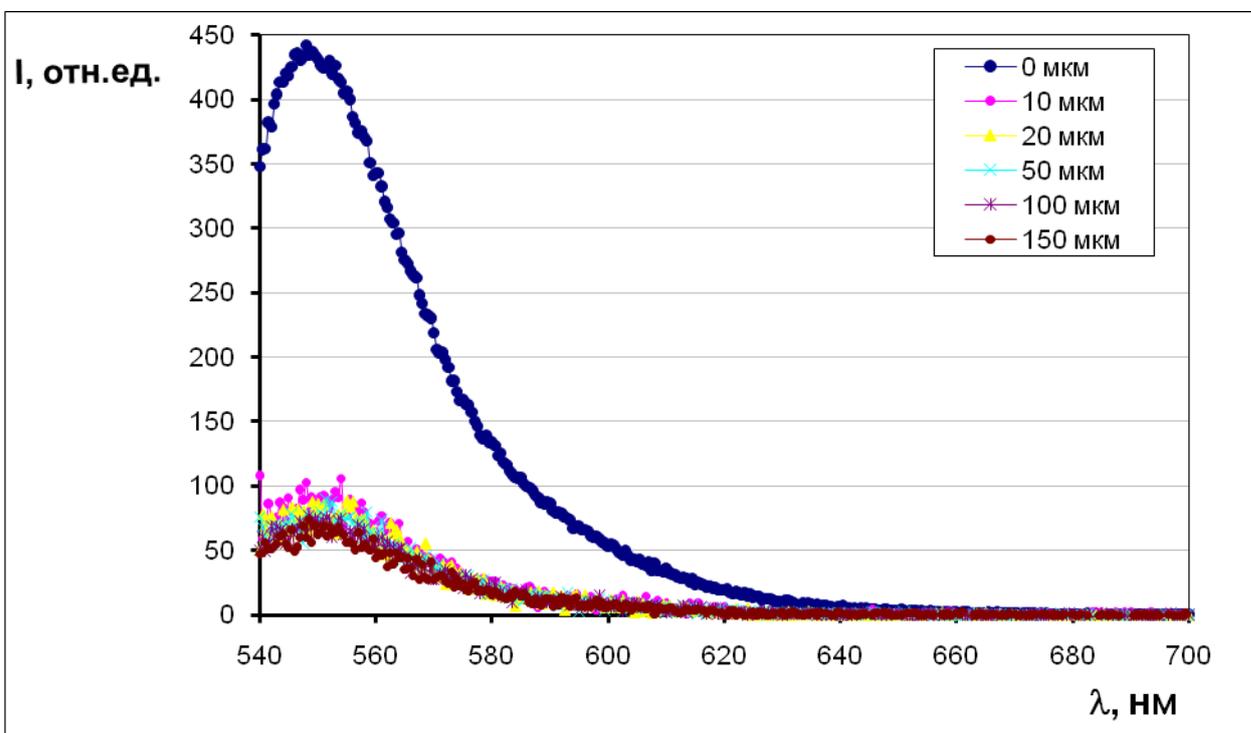


Рис. 3.9. Спектры флуоресценции ($\lambda_{возб}=530$ нм) эритрозина (30 мкМ) в растворах (рН 3,5) с различными концентрациями сывороточного альбумина человека: 0 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 150 мкМ.

сывороточного альбумина человека при рН 6,0. Видно, что зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ практически линейна, что указывает на один механизм связывания флуоресцеина с альбумином при рН 6,0, это ковалентный механизм. Как следует из рис. 3.10, эффективная константа связывания флуоресцеина с белком при рН 6,0 равна 24790 M^{-1} .

На рис. 3.11. в качестве примера представлено тушение флуоресценции эритрозина добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека при рН 3,5. Видно, что зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ имеет отклонение от линейности, что указывает на два механизма связывания эритрозина с белком – ковалентный и ионный. Как следует из рис. 3.11, эффективная константа связывания эритрозина с белком, усреднено учитывающая все механизмы связывания, при рН 3,5 равна 24947 M^{-1} .

На рис 3.12 в качестве примера представлено тушение флуоресценции эозина добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека при рН 3,5. Видно, что зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ имеет отклонения от линейности, что указывает на два механизма связывания эозина с альбумином (ковалентный и ионный). Как следует из рис. 3.12, эффективная константа связывания эозина с белком, усреднено учитывающая все механизмы связывания, при рН 3,5 равна 9575 M^{-1} .

Из полученных экспериментальных данных по различным значениям рН (например, для эозина на рис. 3.13, для двух других наномаркеров аналогично) показано, что для каждого наномаркера практически линейная зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ наблюдается при $\text{pH} \geq 6,0$, что говорит об одном ковалентном механизме связывания наномаркеров с альбумином. В то время как при $\text{pH} < 6,0$ наблюдаются отклонения от линейности зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$, что указывает на наличие двух механизмов связывания (ковалентного и ионного) каждого наномаркера с белком.

Для учета обоих механизмов (ковалентного и ионного) взаимодействия наномаркеров с белком и сравнения наномаркеров между собой определены

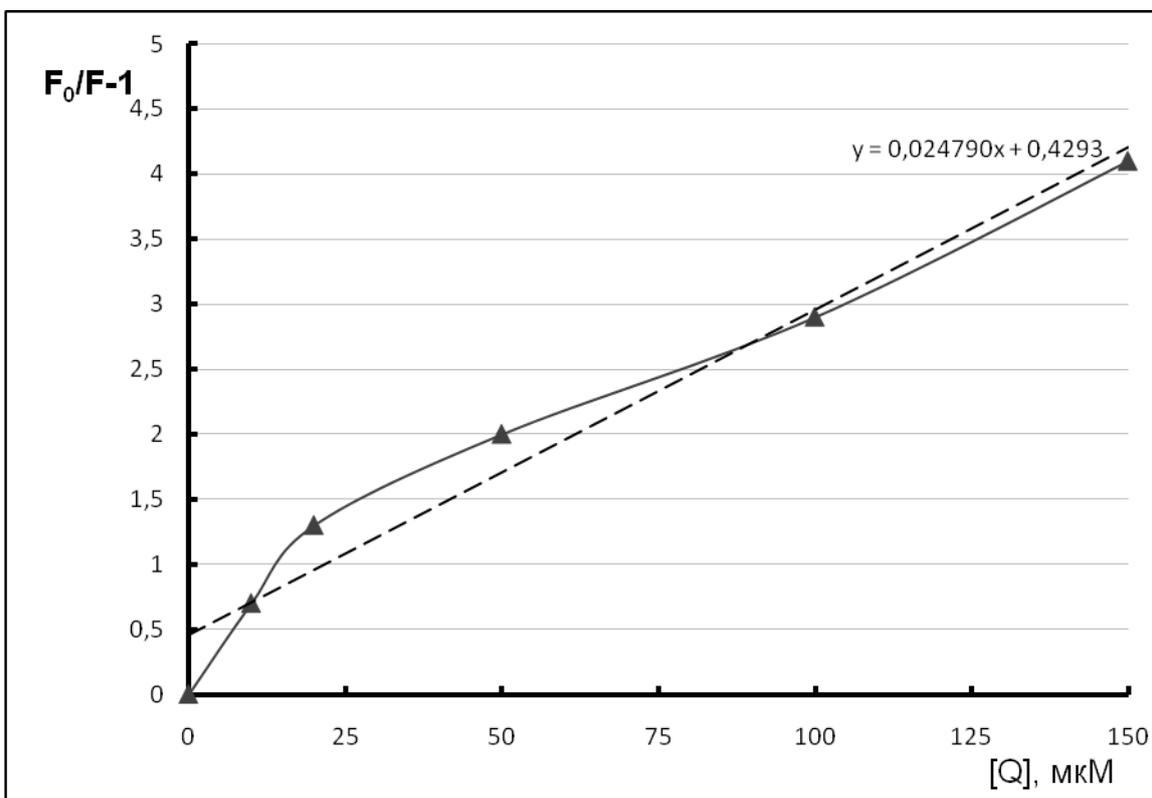


Рис. 3.10. График Штерна – Фольмера тушения флуоресценции флуоресцеина (3 μM) добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека в растворах при рН 6,0.

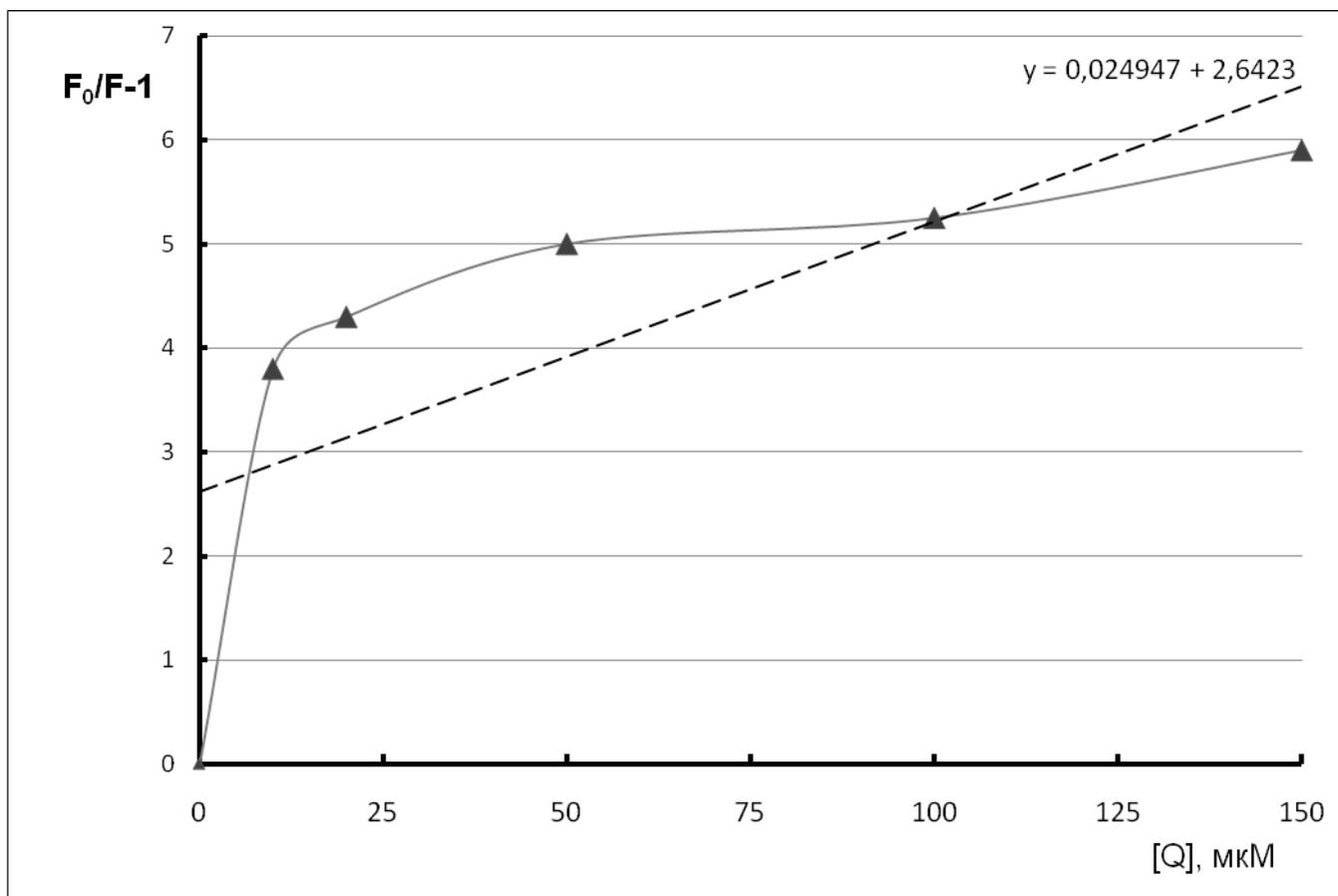


Рис. 3.11. График Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эритрозина (30 μM) добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека в растворах при рН 3,5.

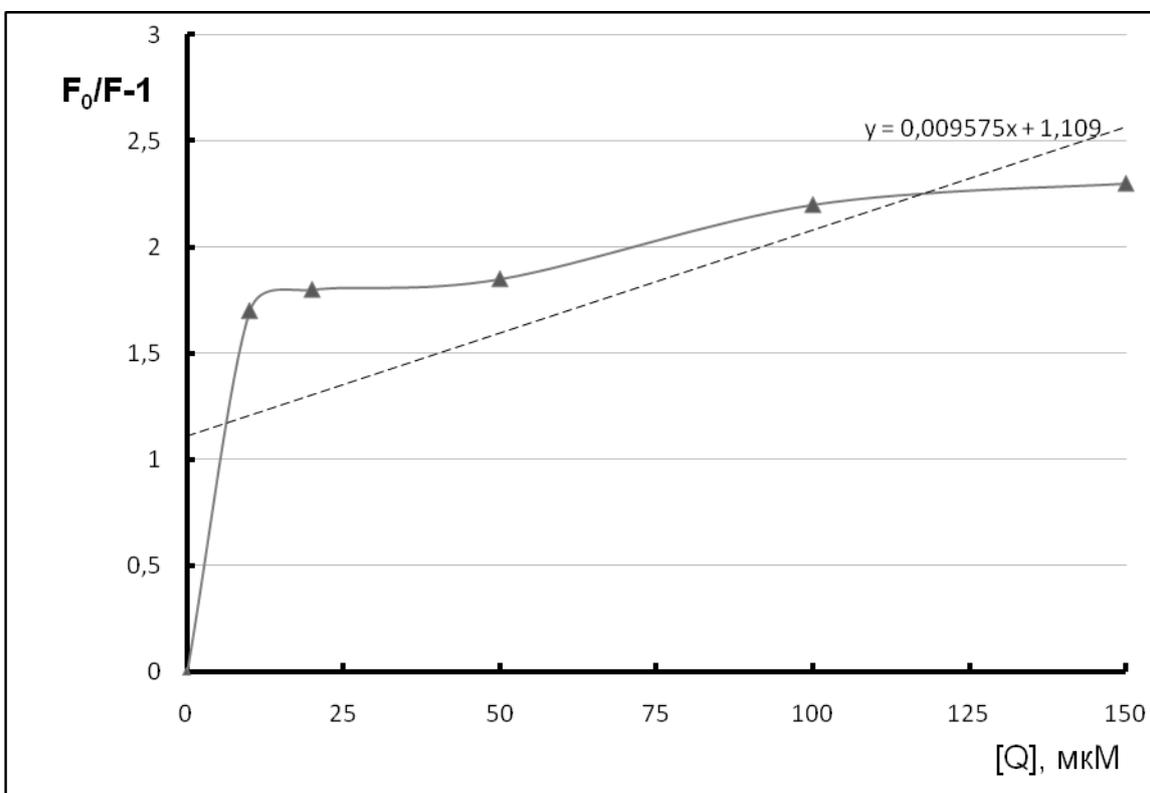


Рис. 3.12. График Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эозина (30 мкМ) добавлением различных концентраций сывороточного альбумина человека в растворах при рН 3,5.

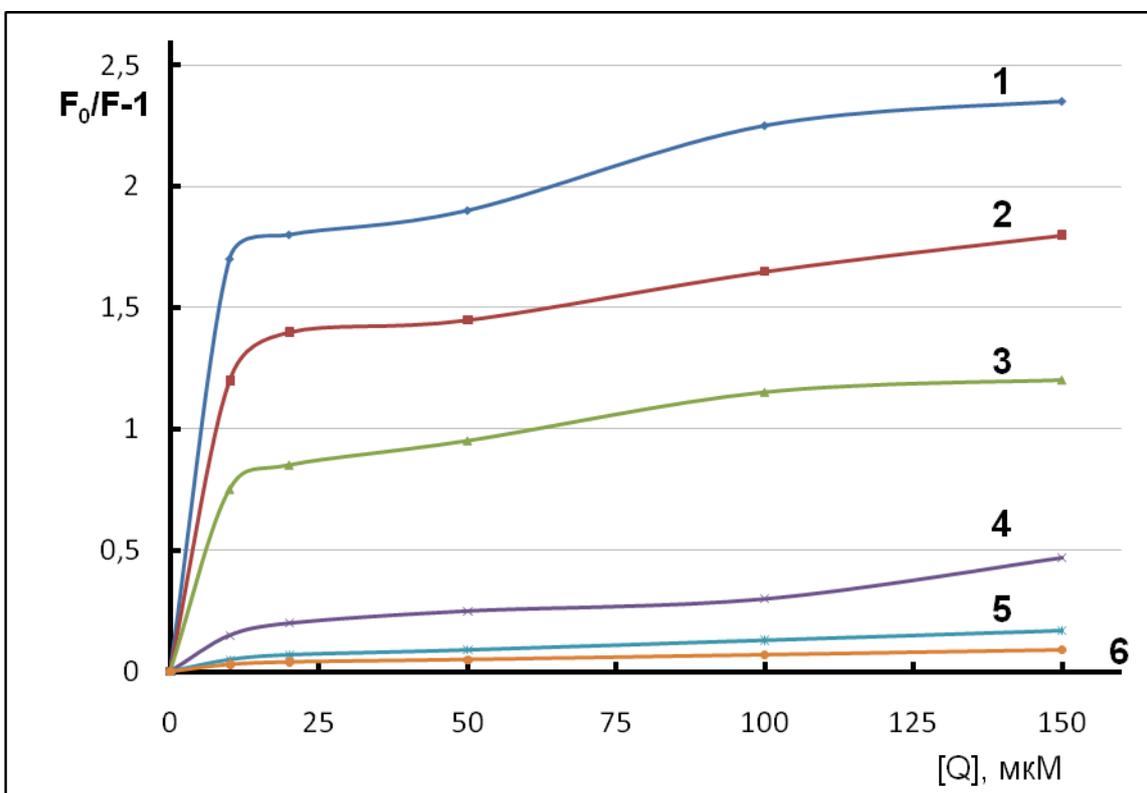


Рис. 3.13. График Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эозина (30 мкМ) добавлением сывороточного альбумина человека при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

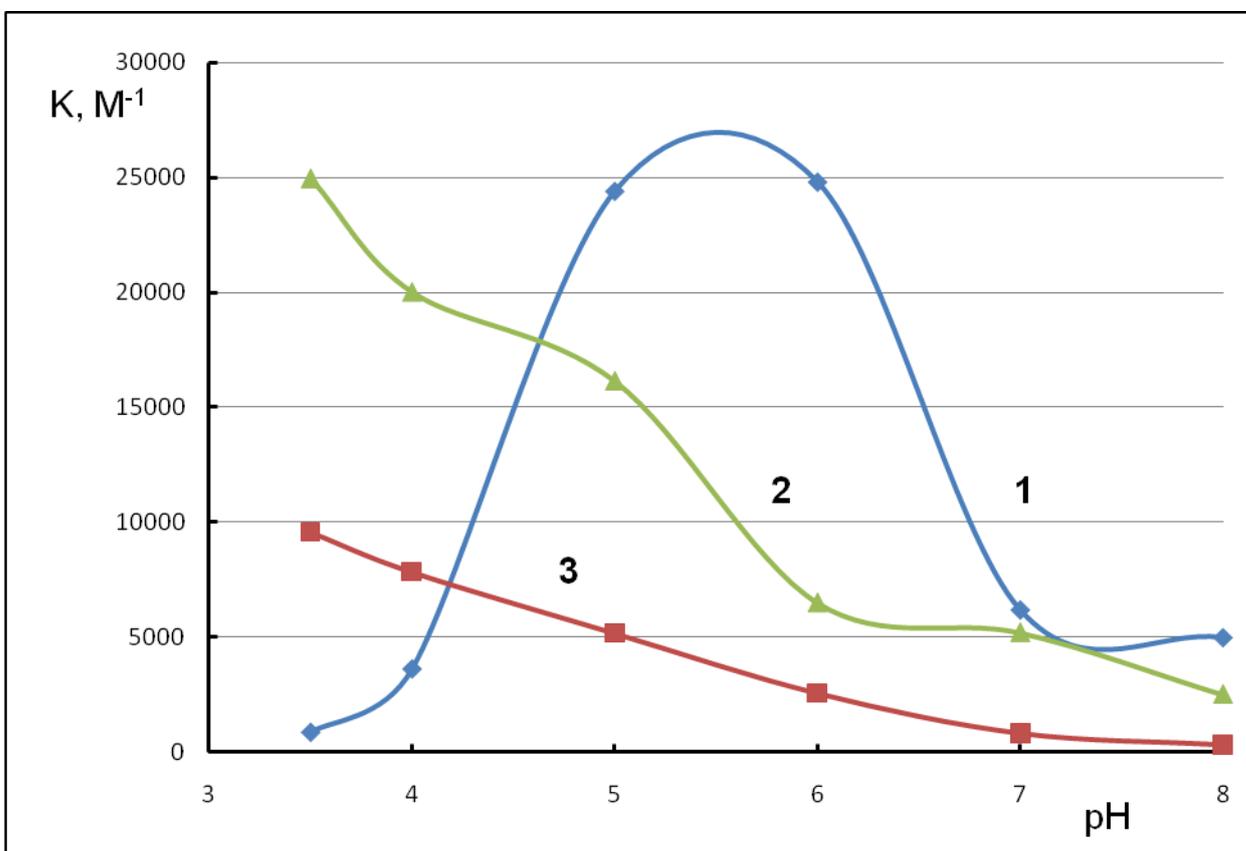


Рис. 3.14. Зависимость эффективной константы связывания наномаркеров с сывороточным альбумином человека от рН: 1 - флуоресцеин, 2 – эритрозин, 3 – эозин.

(по линейной аппроксимации) эффективные константы связывания наномаркеров с альбумином при различных значениях рН.

На рис. 3.14 представлен график Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эозина (30 мкМ) добавлением сывороточного альбумина человека при различных значениях рН. Из рисунка для флуоресцеина видно, что максимально эффективное связывание флуоресцеина с альбумином имеет место при рН 5,0 – 6,0 что объясняется взаимным соотношением зарядов белка и наномаркера: молекулы флуоресцеина либо слабо положительно заряжены (при рН 5,0 – 5,5) либо электрически нейтральны (при рН 5,5 – 6,0), а альбумин слабо отрицательно заряжен (рI 4,7).

Из рис. 3.14 для эритрозина видно, что максимально эффективное связывание эритрозина с альбумином имеет место при рН меньших 5,0: белок в целом положительно заряжен, а эритрозин или находится в нейтральной форме (при рН меньше 3,5) или находится в слабо отрицательно заряженной форме моноаниона (при рН 3,5 – 5,0).

Из рис. 3.14 для эозина видно, что максимально эффективное связывание эозина с альбумином имеет место при рН, меньших 5,0: белок в целом положительно заряжен, а эозин находится в отрицательно заряженной форме моноаниона (рН 3,0 – 5,0).

Для флуоресцеина характерна нелинейная зависимость эффективной константы связывания его с белком от рН с максимумом примерно при рН 6,0. Галоген – производные флуоресцеина характеризуется монотонно убывающей зависимостью эффективной константы связывания их с альбумином при увеличении рН.

Из сравнения величин эффективных констант связывания наномаркеров с альбумином между собой в области от рI сывороточного альбумина человека (4,7) и до области физиологического значения рН (7,4) видно, что наибольшее значения имеют эффективные константы связывания флуоресцеина с альбумином, наименьшие значения имеют эффективные

константы связывания эозина с альбумином, а эффективные константы связывания эритрозина с альбумином занимают промежуточное положение.

§3.3 Исследование изменений вторичной структуры сывороточного альбумина человека при связывании им наномаркеров семейства флуоресцеина при различных значениях рН

В работе методом КР – спектроскопии ближней инфракрасной области с Фурье – преобразованием по анализу спектральных линий Амид-I и Амид-III исследованы изменения во вторичной структуре сывороточного альбумина человека при связывании этим белком наномаркеров семейства флуоресцеина при различных значениях рН.

Колебания Амид-I и Амид-III, используемые для исследования вторичной структуры белков, - это колебания основной полипептидной цепи белка, они имеют следующие значения: 1) Амид-I – 1645-1655 см^{-1} (α -спираль), 1670-1680 см^{-1} (β -структура), 1660-1670 см^{-1} (хаотический клубок); 2) Амид-III – 1270-1280 см^{-1} (α -спираль), 1230-1240 см^{-1} (β -структура), 1240-1260 см^{-1} (хаотический клубок).

Вторичная структура нативного (до связывания наномаркеров) сывороточного альбумина человека, стабилизируемая водородными связями между пептидными группами аминокислотной цепи, состоит из α -спиральных участков и участков хаотической укладки. В работе исследованы рамановские пики, отвечающие за α -спиральные и хаотические участки сывороточного альбумина человека.

В качестве примеров представлены спектральные рамановские линии Амидов в спектрах растворов сывороточного альбумина и наномаркеров при различных значениях рН: рис. 3.15 – линия Амид-I в спектрах разностных растворов (рН 6,0) альбумина до и после связывания флуоресцеина, рис. 3.16

– линия Амид-III в разностных спектрах растворов (рН 6,0) альбумина до и после связывания флуоресцеина, рис. 3.17 – линия Амид-I в разностных спектрах растворов (рН 5,0) альбумина до и после связывания эозина, рис. 3.18 – линия Амид-III в разностных спектрах растворов (рН 5,0) альбумина до и после связывания эозина, рис. 3.19 – линия Амид-I в разностных спектрах растворов (рН 7,0) альбумина до и после связывания эритрозина, рис. 3.20 – линия Амид-III в разностных спектрах растворов (рН 7,0) альбумина до и после связывания эритрозина.

Определено процентное содержание α -спиралей в нативных молекулах сывороточного альбумина человека (до связывания наномаркеров) при различных значениях рН, а также определено процентное содержание α -спиралей в альбумине после связывания им наномаркеров при различных значениях рН (рис. 3.21). Видно, что в нативном белке процентное содержание α -спиралей практически постоянно и не зависит от значения рН, в данном диапазоне рН, где отсутствует кислотно-индуцированная денатурация белка. Отличная картина наблюдается при связывании сывороточным альбумином человека наномаркеров семейства флуоресцеина. Для альбумина, связавшего флуоресцеин, характерна нелинейная зависимость процентного содержания α -спиралей от рН с минимумом при рН 6,0. При связывании альбумином галоген-производных флуоресцеина (эозина и эритрозина) характер зависимости меняется и процентное содержание α -спиралей монотонно возрастает с ростом рН.

Также в работе определен относительный процент α -спиралей в сывороточном альбумине человека, связавшем наномаркеры при различных рН, от их первоначального количества в нативном белке (рис. 3.22). Видно, что характер зависимостей от рН относительного содержания α -спиралей в альбумине различается при связывании им флуоресцеина и при связывании им галоген-производных флуоресцеина (эозина и эритрозина).

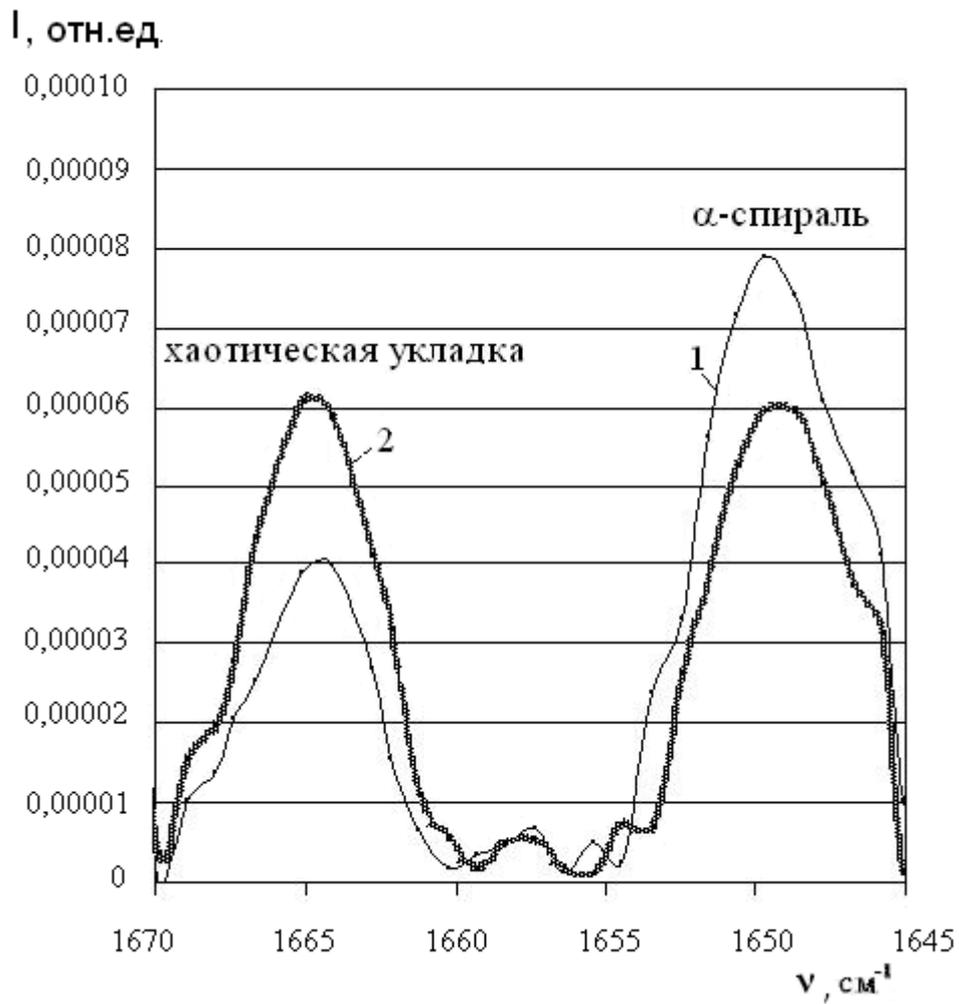


Рис.3.15. Линия Амид-I в разностных рамановских спектрах растворов (рН 6,0) сывороточного альбумина человека (150 мкМ) до связывания флуоресцеина (1) и после связывания 5 мкМ флуоресцеина (2).

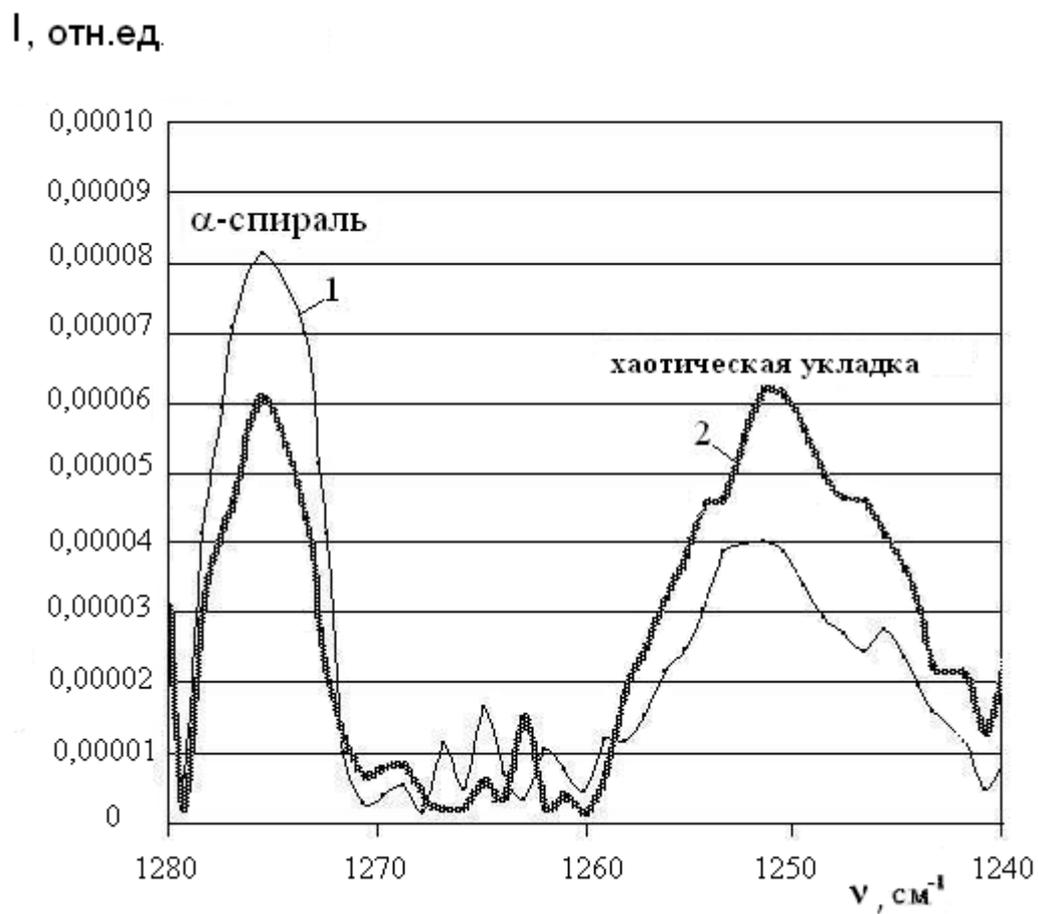


Рис. 3.16. Линия Амид- III в разностных рамановских спектрах растворов (рН 6,0) сывороточного альбумина человека (150 мкМ) до связывания флуоресцеина (1) и после связывания 5 мкМ флуоресцеина (2).

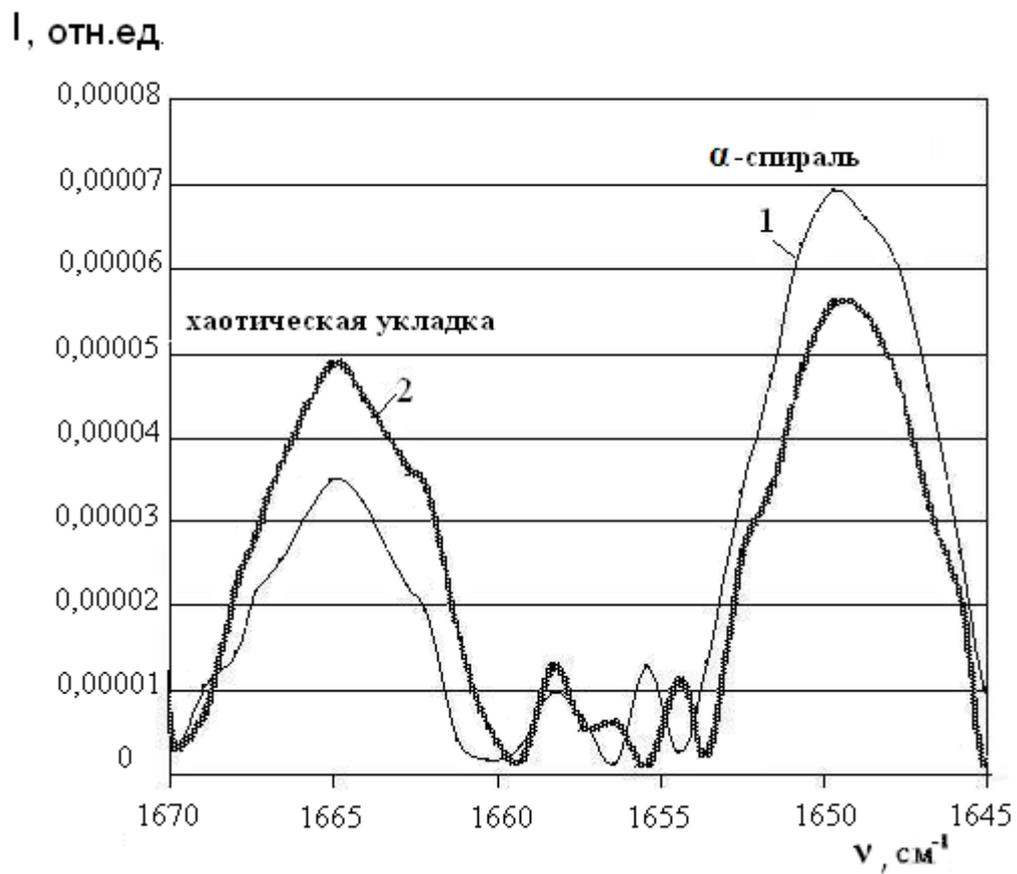


Рис.3.17. Линия Амид-I в разностных рамановских спектрах растворов (рН 5,0) сывороточного альбумина человека (150 мкМ) до связывания эозина (1) и после связывания 30 мкМ эозина (2).

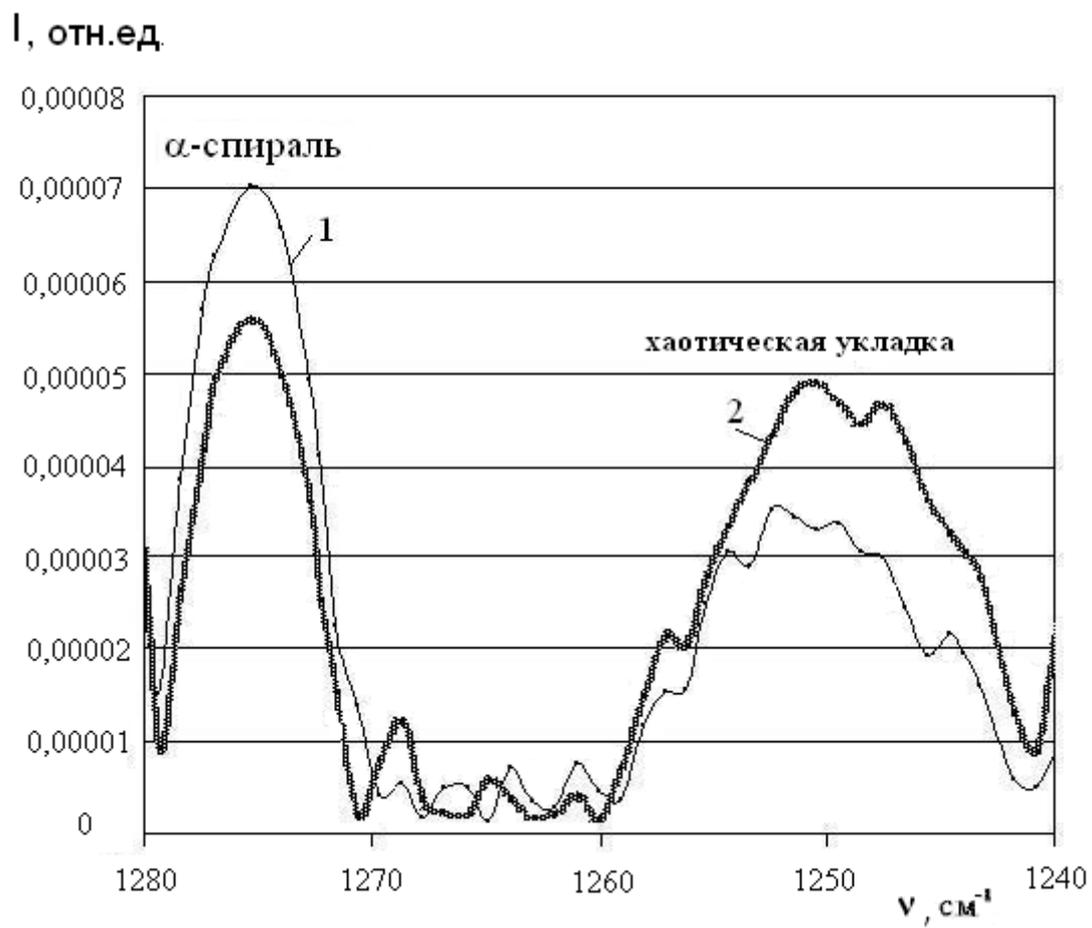


Рис.3.18. Линия Амид- III в разностных рамановских спектрах растворов (рН 5,0) сывороточного альбумина человека (150 мкМ) до связывания эозина (1) и после связывания 30 мкМ эозина (2).

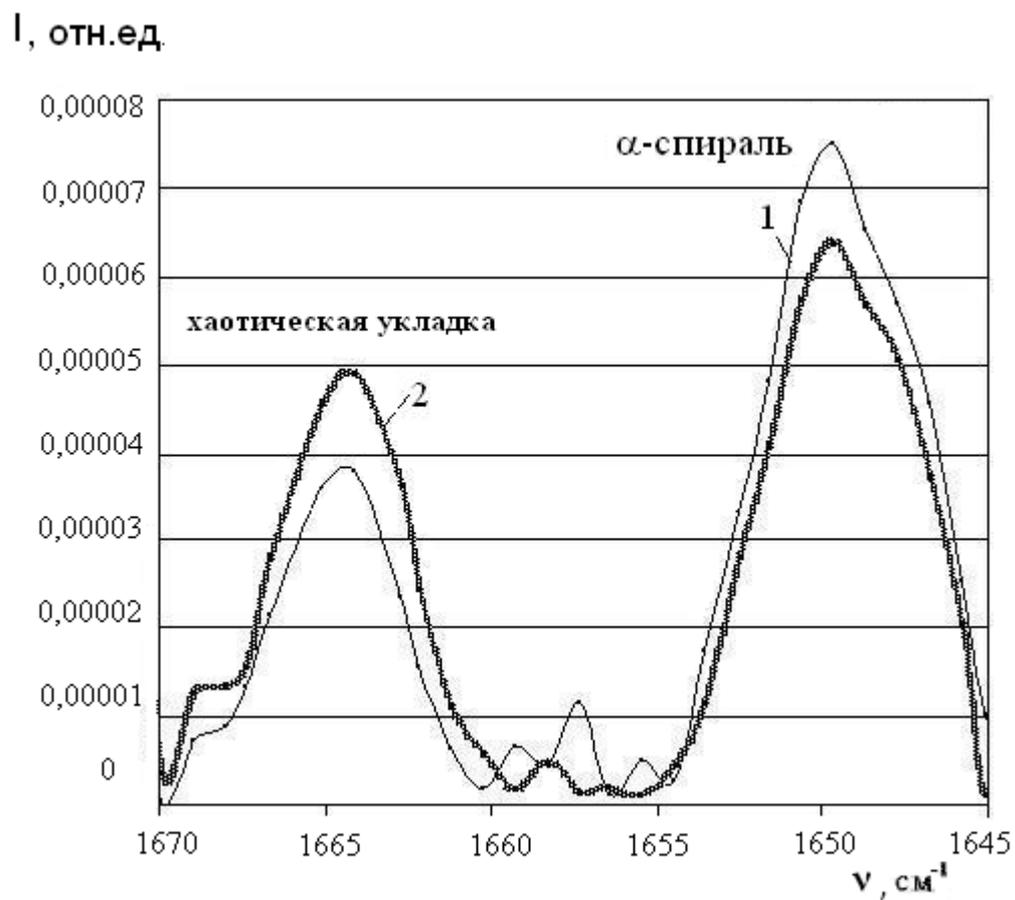


Рис.3.19. Линия Амид-I в разностных рамановских спектрах растворов (рН 7,0) сывороточного альбумина человека (150 мкМ) до связывания эритрозина (1) и после связывания 5 мкМ эритрозина (2).

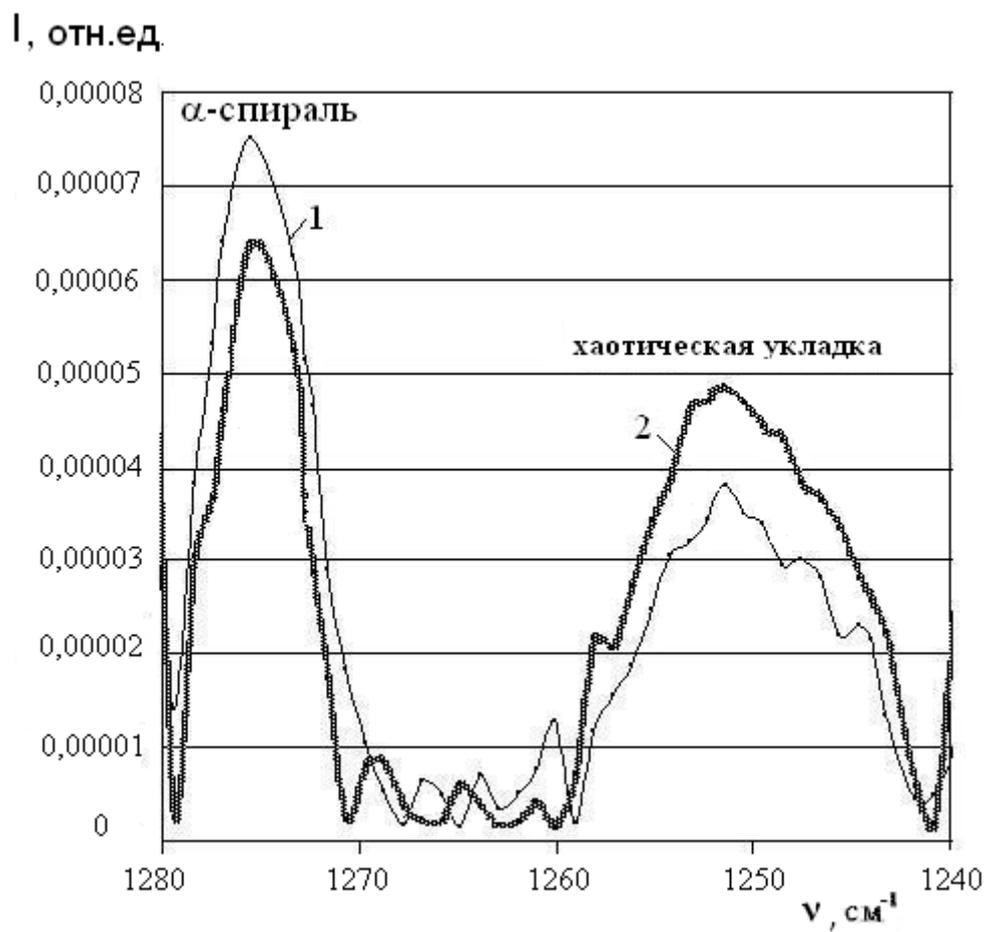


Рис.3.20. Линия Амид-III в разностных рамановских спектрах растворов (рН 7,0) сывороточного альбумина человека (150 мкМ) до связывания эритрозина (1) и после связывания 5 мкМ эритрозина (2).

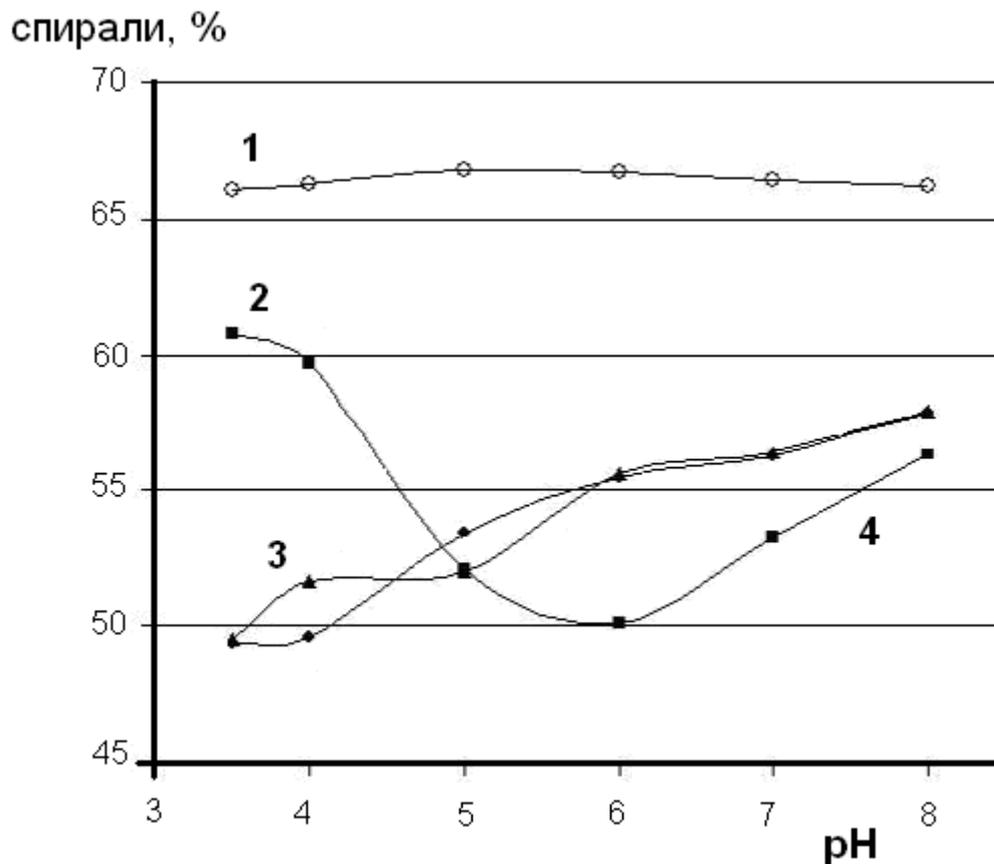


Рис. 3.21. Процентное содержание спиральных участков во вторичной структуре сывороточного альбумина человека при различных значениях рН до и после связывания наномаркеров семейства флуоресцеина: 1 – до связывания, 2 – после связывания флуоресцеина, 3 – после связывания эритрозина, 4 – после связывания эозина.

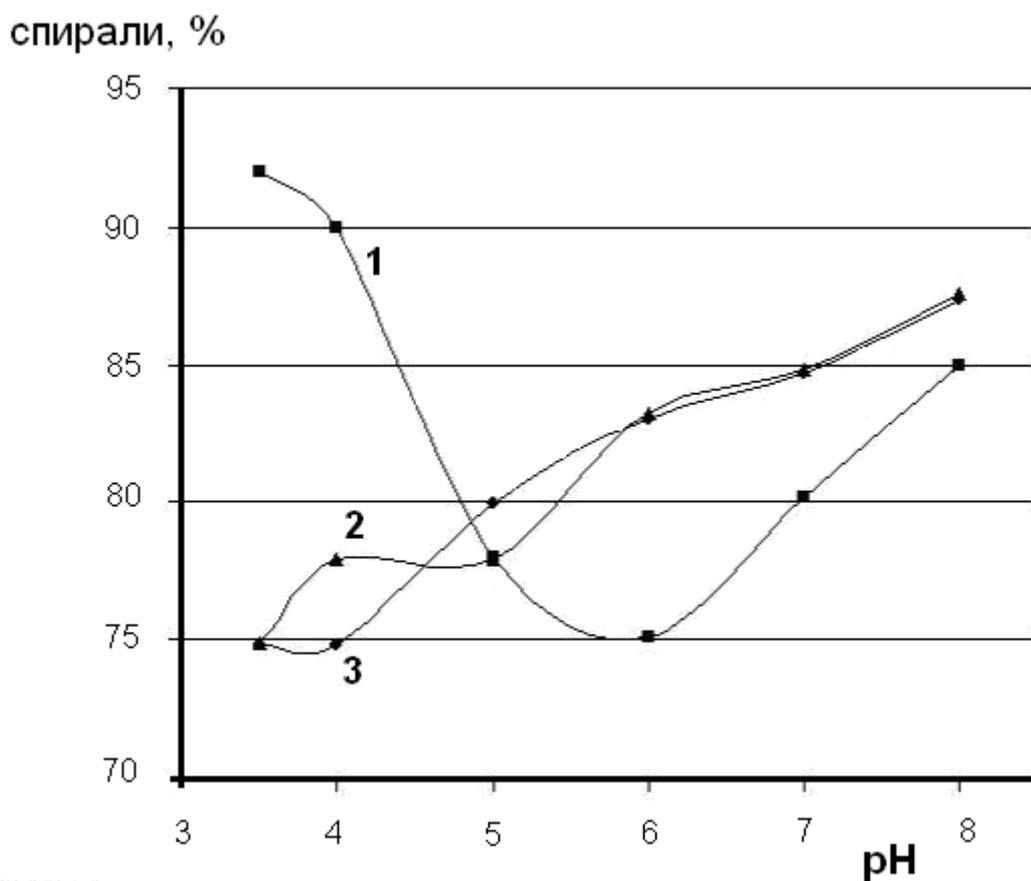


Рис. 3.22. Относительный процент спиралей от их первоначального количества в нативном сывороточном альбумине человека после связывания наномаркеров семейства флуоресцеин: 1 – флуоресцеина, 2 – эритрозина, 3 – эозина.

Данные закономерности в процентном содержании α -спиралей в альбумине объясняются зависимостями связывания белка с наномаркерами от рН растворов. Флуоресцеин лучше всего связывается с альбумином при рН 5,0 – 6,0, поэтому при этих значениях рН и происходит наибольшее уменьшение α -спиралей во вторичной структуре альбумина. Эозин и эритрозин лучше всего связываются с сывороточным альбумином человека при значениях рН, меньших 5,0, поэтому при этих рН и происходит наибольшее уменьшение α -спиралей во вторичной структуре альбумина.

Таким образом, методом КР – спектроскопии исследовано влияние связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека на вторичную структуру этого белка при различных значениях рН растворов.

Основные результаты и выводы

1. Показано, что при связывании наномаркеров семейства флуоресцеина (исходного соединения флуоресцеина и его галоген–производных – эозина и эритрозина) с молекулами сывороточного альбумина человека происходит тушение флуоресценции наномаркеров.
2. Обнаружено, что отличия во флуоресцентно–спектральных характеристиках флуоресцентных наномаркеров, принадлежащих одному гомологическому ряду, определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов.
3. Определены эффективные константы связывания трех флуоресцентных наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека при различных рН. Показано, что зависимость значений эффективной константы связывания наномаркеров с белком от рН имеет для флуоресцеина нелинейный вид с максимумом при рН 6,0, а для эозина и эритрозина эта зависимость имеет монотонно– убывающий с ростом рН характер.
4. Обнаружено, что отличия в эффективных константах связывания наномаркеров с альбумином определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов в структурных формулах наномаркеров.
5. Методом КР –спектроскопии определены конформационные перестройки, состоящие в уменьшении α -спиральных участков сывороточного альбумина человека, при связывании им наномаркеров семейства флуоресцеина при различных рН.

Список литературы

1. Л.В. Левшин, А.М. Салецкий «Оптические методы исследования молекулярных систем», 1994 год, Издательство Московского университета.
2. Дж. Лакович «Основы флуоресцентной спектроскопии», М.: Мир, 1986.
3. Ю.А. Пентин, Л.В. Вилков «Физические методы исследования в химии», 2003 год, Издательство «АСТ».
4. Г.Е. Добрецов, «Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов», 1989 год, Издательство «Наука».
5. И.М. Власова, А.М. Салецкий «Кр-спектроскопия в сравнительных исследованиях механизмов связывания трех молекулярных зондов – флуоресцеина, эозина и эритрозина – с сывороточным альбумином человека», *Laser Physics Letters*, 2008, №11, 834-839.
6. И.М. Власова, Д.В. Полянский, Салецкий А.М. «Исследование методом спектроскопии комбинационного рассеяния света механизма связывания сывороточного альбумина человека с молекулярным зондом эозином », *Laser Physics Letters*, 2006, № 5, 390-394.
7. И.М. Власова, А.М. Салецкий «Спектроскопия комбинационного рассеяния света в исследованиях механизма связывания сывороточного альбумина человека с молекулярным зондом флуоресцеином», *Laser Physics Letters*, 2008, № 5, 384-389.
8. Е.М. Бухарова, И.М. Власова, А.М. Салецкий «Структура молекулярных ассоциатов флуоресцентных зондов в растворах сывороточного альбумина человека», *Журнал прикладной спектроскопии*, 2008, том 75, №6, 783-788.
9. X. Diaz, E. Aduin, E. Lissi «Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations Its relationship to surfactant-protein association», *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2002, 157-162.

10. Liliana Birla, Ana-Maria Cristian, Mihaela Hillebrand, «Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin», Journal «Spectrochimica Acta», 2003, 551-556.
11. S.M.T. Shaikh, J. Seethamappa, P.B. Kandagal, D.H. Manjunatha, S. Ashoka «Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin», Journal «Dyes and pigments», 2006, 1-6.
12. Sang Hak Lee, Jung Kee Suh, and Ming Li «Determination of Bovine Serum Albumin by Its Enhancement Effect of Nile Blue Fluorescence», Bull. Korean Chem. Soc., 2003, vol. 24, №1, 45-48.
13. Sebnem Ercelen, Andrey S., Klymchenko, Alexandr P. Demchenko «Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin, FEBS Letters, 2002, 25-28.
14. H. Yamini Shrivastava, Balachandran Unni Nair «A fluorescence-based assay for nanogram quantification of proteins using a protein binding ligand», Original Paper, 2002, 169-174.
15. И.М. Власова, А.М. Салецкий «Флуоресцентные характеристики зондов семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина», Вестник Московского университета, Серия 3, № 4, 2009 год, С.52-56.
16. А.Д. Дергунов, Ю.Ю. Воротникова «Взаимодействие сывороточного альбумина с апобелком Е и липопротеидами очень низкой плотности плазмы крови человека», Биохимия. 1993. Т. 58, вып. 6. С. 944-952.
17. А. Г. Мельников, А. М. Салецкий, В. И. Кочубей, А. Б. Правдин, И. С. Курчатов, Г. В. Мельников «Триплет – триплетный перенос энергии между люминесцентными зондами, связанными с альбуминами», Оптика и спектроскопия, том 109, № 2, 2010, С. 216-221.
18. И.М. Власова, А.Ю. Землянский А.М. Салецкий «Спектрально-люминесцентные характеристики эозина в растворах сывороточного альбумина человека при его денатурации под воздействием додецилсульфата натрия», Журнал прикладной спектроскопии, 2006, том 73, №5, стр: 661-665.

19. И.М. Власова, А.М. Салецкий «Флуоресценция молекулярного зонда эозина в растворах сывороточного альбумина человека с органическими и неорганическими лигандами», Химическая физика, 2008, том 27, №4, стр:60-64.
20. А.М. Салецкий, А.Г. Мельников, А. Б. Правдин, В.И. Кочубей «Структурные изменения в сывороточном альбумине человека по данным кинетики фосфоресценции люминесцентного зонда - эозина», Журнал прикладной спектроскопии, 2005, том 72, №5, стр:660-663.