

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ В СИСТЕМЕ БЕЛОК-
НАНОМАРКЕР**

Выполнил студент

205М группы:

Городничев Евгений Сергеевич

подпись студента

Научный руководитель:

Ассистент,

Кулешова А. А.

подпись научного руководителя

Допущен к защите

Зав. кафедрой _____
подпись зав. кафедрой

Москва

2017

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Применение красителей в исследованиях биологических объектов (литературный обзор)	
§1.1. Физические основы электронной спектроскопии: спектры поглощения и спектры флуоресценции.....	6
§1.2. Определение степени ассоциации растворов.....	11
§1.3. Флуоресцентные зонды. Свойства наномаркеров семейства флуоресцеина.....	13
§1.4. Флуоресцентная спектроскопия и абсорбционная спектроскопия с применением наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул.....	16
Глава 2. Методическая часть эксперимента	
§2.1. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и наномаркеров.....	32
§2.2. Методика экспериментов для исследования спектров поглощения красителя в растворах бычьего сывороточного альбумина с различными значениями рН.....	32
§2.3. Методика экспериментов для исследования зависимости спектров поглощения красителя в растворах бычьего сывороточного альбумина от температуры с различными значениями рН.....	33

Глава 3. Исследование процессов взаимодействия флуоресцентного наномаркера с белком

§3.1. Спектры поглощения и степень ассоциации растворов эозина, содержащих и не содержащих БСА.....35

§3.2. Энергетические характеристики эозина в растворах БСА.....47

Основные результаты и выводы.....52

Список цитируемой литературы.....54

Введение

Методы флуоресцентной спектроскопии с применением флуоресцентных наномаркеров (зондов и меток) с каждым годом всё активнее применяются в лабораторных исследованиях и используются в физике, химии, биологии. На основе этих методов можно распознавать молекулы и различные вещества, получать качественные и количественные характеристики. Одной из важных составляющих этих методов является получение результатов за минимальные сроки без инвазивного воздействия. В частности, с помощью этих методов исследуется строение бычьего сывороточного альбумина, как нативных молекул, так и претерпевших химическую модификацию вследствие внешних воздействий. Методы хороши и тем, что позволяют получать точные результаты при небольших количествах биологического объекта.

Белки формируют класс биомолекул, которые играют важную роль в процессах метаболизма и служат индикатором соматических изменений. Бычий сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок плазмы крови (молекулярная масса 64 кДа, изоэлектрическая точка pI 4,9). Его концентрация в плазме и сыворотке (35-55 мг/мл) выше, чем концентрация других белков. Молекулы бычьего сывороточного альбумина состоят из 582 аминокислотных остатков. Третичная структура бычьего сывороточного альбумина определяется тремя доменами, каждый из которых, в свою очередь, подразделяется на два под-домена. В лабораторных исследованиях бычий сывороточный альбумин применяется в качестве стандарта в различных методах количественного определения белков, а также является удобной моделью для изучения свойств глобулярных белков в целом. Именно альбумин вносит основной вклад во внутрисосудистое коллоидно-осмотическое давление, регулирует вместе с другими белками плазмы pH крови, а также является молекулой-переносчиком биологически

важных веществ. Уникальная способность молекулы сывороточного альбумина связывать обширный круг лигандов определяет одну из основных и наиболее важных функций этого белка – транспорт физиологических метаболитов. Механизм связывания лигандов с молекулой сывороточного альбумина определяется наличием на белке специфических участков – связывающих центров. Некоторые реакции связывания обеспечиваются электростатическим взаимодействием, другие – носят ковалентный характер, вызывая химические модификации боковых цепей аминокислотных остатков.

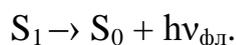
К классическим флуоресцентным наномаркерам семейства флуоресцеина относятся – исходное соединение флуоресцеин и его галоген-производные: тетра-йод-производная флуоресцеина – эритрозин, тетра-хлор-тетра-йод-производная флуоресцеина – бенгальский розовый, а также тетра-бром-производная флуоресцеина – эозин, который используется в данной работе.

Люминесцентные зонды (наномаркеры) чрезвычайно чувствительны даже к незначительным изменениям окружающей их сложной системы, будь то живая клетка или буферный раствор с белком. Задачей флуоресцентной спектроскопии является анализ подобных сигналов, изменений и трансформаций. Для исследования структурно – динамического состояния белковых молекул широко используются флуоресцентные наномаркеры. Наномаркеры семейства флуоресцеина в настоящее время используются для исследования связывающих центров сывороточного альбумина, их физико-химических и структурных свойств с целью моделирования с помощью этих наномаркеров связывания с альбумином ряда лекарственных препаратов для анализа их фармакинетики. Поэтому представляет интерес исследовать собственные флуоресцентные характеристики наномаркера эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина, что и являлось целью настоящей дипломной работы.

Глава 1. Флуоресцентная и абсорбционная спектроскопия наномаркеров (зондов) в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)

§1.1. Физические основы электронной спектроскопии: спектры поглощения и спектры флуоресценции

Флуоресценция – излучательный переход из возбужденного состояния с синглетного уровня S_1 в основное состояние S_0 :



Такие переходы квантово-механически разрешены, а типичные величины скоростей испускания для них $\sim 10^8 \text{ с}^{-1}$. Высокие значения скоростей испускания приводят к временам затухания флуоресценции $\sim 10^{-8} \text{ с}$. Время жизни – это средний период времени, в течении которого флуорофор находится в возбуждённом состоянии. Наряду с фосфоресценцией, флуоресценция является видом люминесценции, классифицированной по продолжительности процесса излучения. В этом смысле флуоресценция - более быстрый процесс.

Флуоресцентные спектральные данные обычно представляют в виде спектров испускания. Спектр испускания флуоресценции – это зависимость интенсивности флуоресценции от длин волн (в нанометрах) или волновых чисел (в см^{-1}). Спектры флуоресценции сильно изменяются и зависят как от химической структуры флуорофора, так и от растворителя, в котором флуорофор растворён.

Поглощение и испускание света хорошо иллюстрирует диаграмма уровней энергии, предложенная Яблонским. Основное, первое и второе электронные состояния обозначают S_0 , S_1 и S_2 соответственно. Каждый из этих уровней энергии может состоять из множества колебательных энергетических уровней, обозначаемых 0, 1, 2 и т.д. Переходы между различными электронными уровнями обозначены вертикальными линиями.

Такое представление используется, чтобы наглядно показать мгновенную природу поглощения света. Этот процесс происходит примерно за 10^{-15} с.

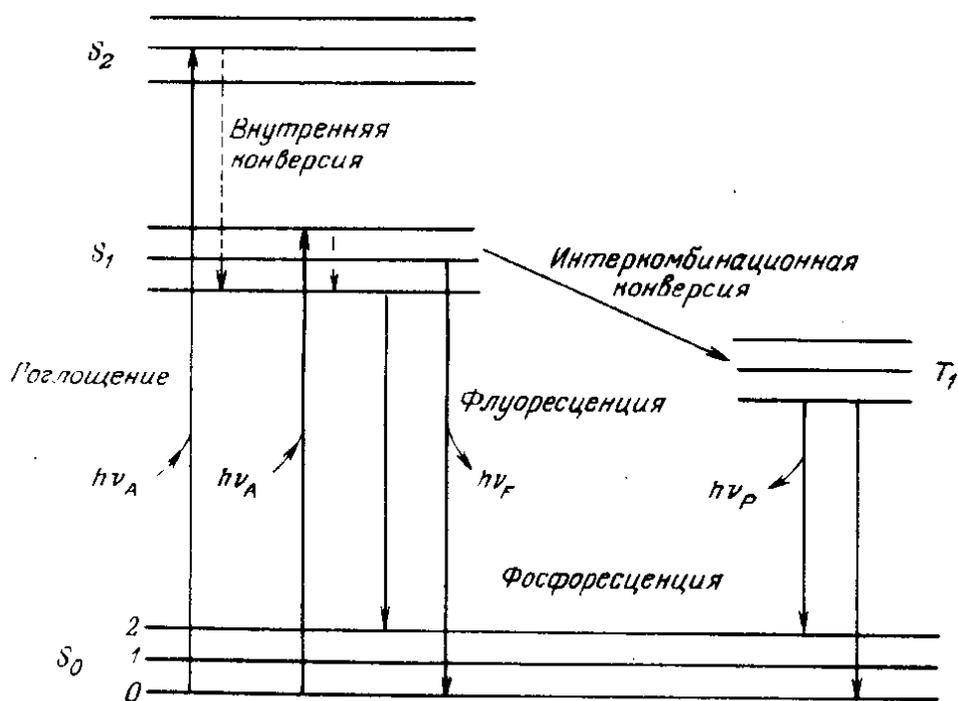


Рисунок 1 - Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы

Возбуждение флуорофора, как правило, происходит до некоторого высшего колебательного уровня состояний S_1 , либо S_2 . За некоторыми редкими исключениями, для молекул характерна быстрая релаксация на самый нижний колебательный уровень состояния S_1 . Этот процесс называется внутренней конверсией и происходит большей частью за 10^{-12} с. Поскольку типичные времена затухания флуоресценции близки к 10^{-8} с, внутренняя конверсия обычно полностью заканчивается до процесса испускания. Следовательно, испускание флуоресценции чаще всего осуществляется из термически равновесного возбуждённого состояния. На испускание флуоресценции также могут влиять такие факторы, как влияние растворителей, релаксация растворителя, тушение, а также реакции, происходящие в возбуждённых состояниях.

Одним из важных свойств флуоресценции является различие её длительности у разных излучающих систем. Длительность свечения

вещества обычно представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекулы остаются в возбуждённом состоянии.

Рассмотрим невозбуждённый (1) и возбуждённый (2) уровни энергии какой-либо люминесцирующей системы. Пусть в результате поглощения возбуждающего света на верхний уровень (2) перешло некоторое число молекул. В момент времени $t=0$ возбуждение прекращается, и на уровне (2) остаётся N_2 молекул. Рассмотрим убыль возбуждённых молекул на верхнем уровне за счёт перехода 2-1 за период времени от t до $t+dt$. Допустим, что в рассматриваемой системе отсутствуют безызлучательные переходы. В этом случае число излучательных переходов за время от t до $t+dt$ равно $N_2 A_{21} dt$, где A_{21} – коэффициент Эйнштейна для спонтанного перехода 2-1. С учётом этого уменьшение числа молекул в возбуждённом состоянии за время dt будет равно

$$dN_{21}(t) = -A_{21}N_2(t)dt, \quad (1)$$

где $N_2(t)$ – заселённость уровня 2 в момент времени t .

Выражение (1) в случае сложной молекулярной системы описывает убыль молекул на низшем колебательном уровне верхнего электронного состояния за счёт перехода на нижний колебательный уровень основного электронного состояния (0-0-переход). Для реальной молекулярной системы уменьшение заселённости $N_2(t)$ уровня 2 будет происходить не только за счёт 0-0-переходов, но и в результате других переходов с рассматриваемого верхнего уровня на разные колебательные уровни основного электронного состояния. Тогда полная убыль молекул $dN_2(t)$ за счёт всех возможных переходов с данного возбуждённого уровня на все нижерасположенные электронно-колебательные уровни может быть определена как

$$dN_2(t) = -\sum dN_{21} = -N_2(t)dt \sum A_{21} \quad (2)$$

Если обозначить полную вероятность спонтанных переходов с верхнего электронного уровня на все колебательные уровни основного состояния через

$$A = \sum A_{21}, \quad (3)$$

то для $dN_2(t)$ получим уравнение

$$dN_2(t) = -AN_2(t)dt \quad (4)$$

Интегрируя его, получим

$$N_2(t) = N_2(0)e^{-At} \quad (5)$$

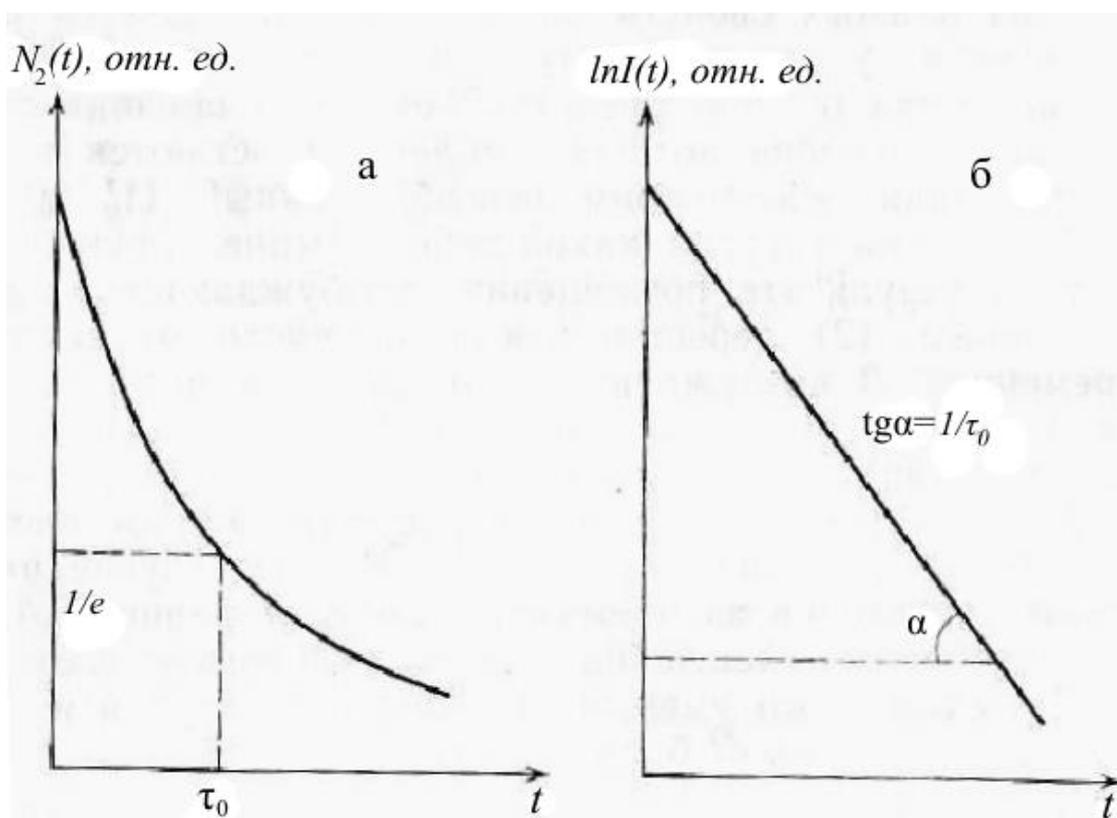


Рисунок 2 - Зависимость N_2 (а) и $\ln I$ (б) от времени t

Экспоненциальное изменение заселённости верхнего уровня 2 во времени связано с тем, что разные молекулы осуществляют акт испускания в разные моменты времени и, следовательно, находятся в возбуждённом состоянии различное время. На рис. 2(а) показано изменение числа возбуждённых молекул со временем. Определим среднюю

продолжительность нахождения исследуемых молекул в возбуждённом состоянии. Время, в течение которого молекулы, испустившие фотоны в период от t до $t+dt$, находились в возбуждённом состоянии, будем считать равным t . Число таких молекул может быть определено из (1.1.4) и (1.1.5):

$$dN_2(t) = -AN_2(0)e^{-At} dt \quad (6)$$

Из (1.1.6) можно установить отношение числа молекул, испустивших фотоны в период времени $t+dt$, к начальному числу возбуждённых молекул:

$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At} dt \quad (7)$$

Среднюю продолжительность пребывания молекул в возбуждённом состоянии можно найти, умножая (1.1.7) на t и затем интегрируя его по t от 0 до ∞ . В результате получаем

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} tAe^{-At} dt = \frac{1}{A} \int_0^{\infty} Ate^{-At} (dAt) = \frac{1}{A} = \tau_0. \quad (8)$$

Время $\tau_0 = \bar{t}$ называется средней длительностью возбуждённого состояния или просто длительностью возбуждённого состояния. Она равна среднему времени пребывания молекул в возбуждённом состоянии и обратно пропорциональна вероятности излучательного перехода.

Длительность возбуждённого состояния можно определить и иным путём. Для характеристики зависимости $N_2(t)$ (рис. 2(а)) введём время τ_0 , в течение которого число возбуждённых частиц уменьшается в e раз. Это время легко находится из уравнения (1.1.5):

$$N_2(\tau) = N_2(0)e^{-A\tau} = \frac{N_2(0)}{e}, \quad (9)$$

откуда

$$\tau = \frac{1}{A}. \quad (10)$$

Зная закон изменения числа возбуждённых молекул со временем, легко найти изменения интенсивности люминесценции на частоте ν . Так как интенсивность свечения пропорциональна N_2 , A и $h\nu$, то при стационарном возбуждении интенсивность люминесценции будет определяться как

$$I(0) = AN_2(0)h\nu \quad (11)$$

После выключения возбуждающего света изменение числа возбуждённых молекул со временем будет определяться уравнением (1.1.5). Уменьшение интенсивности люминесценции в этом случае описывается соотношением

$$I(t) = AN_2(t)h\nu = AN_2(0)e^{-At}h\nu = I(0)e^{-t/\tau}, \quad (12)$$

Выражение (1.1.12) описывает закон затухания люминесценции.

Среднюю длительность свечения, или длительность люминесценции, можно представить в виде

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} tI(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} \quad (13)$$

При подстановке (1.1.12) в (1.1.13) оказывается, что $\bar{t} = \tau_0$, т.е. средняя длительность люминесценции совпадает со средней длительностью возбуждённого состояния и равна времени, в течение которого интенсивность люминесценции уменьшается в e раз. Имея это в виду, среднее время жизни люминесценции можно определить из наклона кривой $\ln I(t)$ к оси t (рис. 2(б)).

§1.2. Определение степени ассоциации растворов

Увеличение концентрации люминесцирующих молекул в растворах обычно приводит к развитию процессов их ассоциации и образованию агрегатов различной сложности (от самых простых димеров до тримеров, тетрамеров, пентамеров и так далее). В результате в растворе появляются

новые поглощающие центры. Возникновение таких агрегатов приводит к изменению оптических свойств растворов. Процессы ассоциации зависят от концентрации, температуры, рН, способности растворителя образовывать водородные связи и т.д. Поэтому следует ожидать влияние на эти процессы содержание белков в растворах.

Когда исследуемый раствор содержит смесь мономеров и димеров красителя, то его показатель поглощения α на некоторой длине волны λ может быть записан в виде

$$\alpha = \alpha_M + \alpha_A(1 - X) = (\alpha_M - \alpha_A)X + \alpha_A, \quad (14)$$

где, α_M , и α_A – показатели поглощения мономеров и ассоциатов исследуемого раствора на длине волны λ соответственно, X – доля молекул красителя, находящихся в растворе в мономерном состоянии; $(1-X)$ – доля его ассоциированных молекул или степень ассоциации раствора.

Описанные концентрационные деформации спектров поглощения позволяют определить величину степени ассоциации $(1-X)$ исследуемых растворов. Для этого используют соотношение (1.13) и так называемый закон разведения Оствальда

$$\frac{X^2}{(1-X)} = \frac{M}{C} \quad (15)$$

где M – константа равновесия, C – общая концентрация раствора. Решая совместно уравнения, получают выражение

$$\frac{(\alpha - \alpha_A)^2}{(\alpha_M - \alpha)} = \frac{M(\alpha_M - \alpha_A)}{C}, \quad (16)$$

которое содержит два неизвестных: α_A, M . Для их определения можно использовать два любых спектра поглощения из семейства исследуемых растворов с концентрациями C_1 и C_2 . Для этих спектров поглощения будут справедливы два уравнения типа:

$$\frac{(\alpha_n - \alpha_A)^2}{(\alpha_M - \alpha_n)} = \frac{M(\alpha_M - \alpha_A)}{C} \quad (17)$$

где $n=1$ и 2 . Решая эту систему из двух уравнений с двумя неизвестными и исключая величину M , можно получить выражение для показателя поглощения ассоциатов α_A на выбранной длине волны λ :

$$\alpha_A = \frac{\alpha_1 - Q\alpha_2}{1 - Q}, \quad (18)$$

где

$$Q = \sqrt{\frac{C_2(\alpha_M - \alpha_1)}{C_2(\alpha_M - \alpha_2)}} \quad (19)$$

Используя полученные значения α_M и α_A , определив из опыта для раствора данной концентрации C значение его показателя поглощения, из уравнения можно установить содержащуюся в нем долю мономеров

$$X = \frac{(\alpha - \alpha_A)}{(\alpha_M - \alpha_A)} \quad (20)$$

а также величину степени ассоциации раствора $(1-X)$.

Также величину степени ассоциации раствора можно определить по стандартной методике разложения спектра поглощения наномаркера-красителя на компоненты мономеров и ассоциатов.

§1.3. Флуоресцентные зонды. Свойства наномаркеров семейства флуоресцеина

При анализе собственной флуоресценции исследуемых биологических материалов не всегда можно получить полную информацию об объекте. В этом случае используют искусственные флуорофоры, т.е. специально синтезированные вещества, имеющий специфический спектр флуоресценции

либо в свободном состоянии, либо при связывании с тем или иным объектом исследования. Флуоресценция таких веществ, как правило, обладает высоким квантовым выходом и достаточно большим временем жизни.

Флуоресцирующие наномаркеры (красители, маркеры, зонды) имеют широкое применение в биофизике, медицине, биологии, фармакологии, химии. Флуоресцентным зондом называют флуоресцирующее вещество, которое при добавлении в раствор с биологическими объектами (мембранами, белками, липопротеинами, клетками и т.п.) связывается с ними. По данным флуоресценции зонда в биологической системе получают информацию о структуре, конформационных изменениях и функциях биологических объектов.

Использование флуоресцентных зондов в исследованиях белковых макромолекул дает большую информацию о строении белковых молекул и о физико-химическом состоянии отдельных участков (сайтов) на белковых макромолекулах. Флуоресцентные молекулярные зонды тонко чувствуют изменения своего окружения и являются высокочувствительными датчиками изменений, происходящих с белковыми молекулами.

Процесс связывания лигандов с сывороточным альбумином обусловлен наличием на белке так называемых связывающих центров. Для исследования I связывающего центра сывороточных альбуминов используются анионные при физиологическом pH 7,4 флуоресцентные наномаркеры семейства флуоресцеина (флуоресцеин (Ф), эозин (Э), эритрозин (Эр), бенгальский розовый (БР)), соединяющиеся непосредственно с ним. Структурные формулы данных флуоресцентных зондов представлены ниже на Рисунке 3. Флуоресцеин и его производные являются флуороновыми красителями, которые принадлежат классу ксантеновых флуорофоров (главным структурным элементом у них является ксантеновый трицикл).

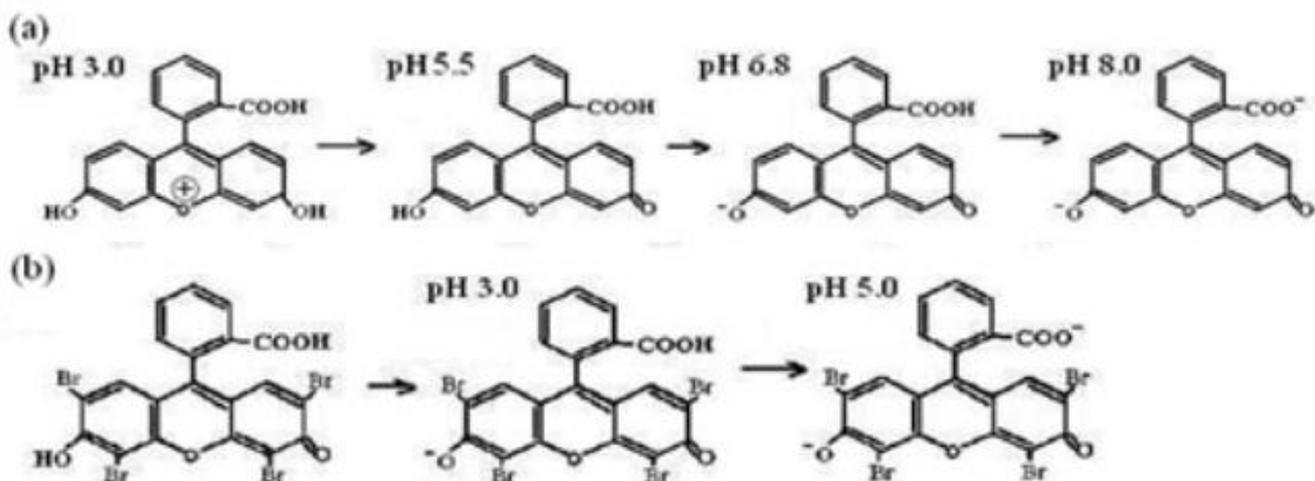


Рисунок 3. Структурные формулы красителей семейства флуоресцеина (флуоресцеина (a), эозина (b) и значения pH ионизированных групп.

Своей популярностью флуоресцеин обязан тому факту, что квантовый выход флуоресценции его дианионной формы молекулы близок к единице. То есть безызлучательные переходы с S_1 , S_0 , T почти не происходят.

Атомы боковых радикалов различной электроотрицательности у наномаркеров семейства флуоресцеина (водорода у флуоресцеина, брома у эозина, влияют на флуоресцентно – спектральные характеристики и параметры молекулярной ассоциации зондов, а также на рК их ионизируемых групп (COOH и OH). Присутствие более электроотрицательного атома в структурной формуле флуоресцентного красителя приводит к сильному уменьшению рК(COOH) и рК(OH) этих зондов.

Для флуоресцеина параметры рК карбоксильной и гидроксильной групп имеют следующие значения: рК(OH) = 6,8; рК(COOH) = 8,0. При значениях pH меньших 5, Ф слабо положительно заряжен. В области pH 5,5 – 6,8 Ф находится в электрически нейтральной форме. При значениях pH 6,8 – 8,0 Ф слабо отрицательно заряжен и является моноанионом. При pH больших 8,0 Ф дианион и находится в сильно отрицательно заряженной форме.

Для наномаркера эозина рК(OH) = 3,0; рК(COOH) = 5,0, то есть при значениях pH < 3,0 он электрически нейтрален, при 3,0 < pH < 5,0 он

находится в слабо отрицательно заряженной форме (моноанион). При pH выше 5,0 Э является дианионом и заряжен сильно отрицательно.

Таким образом, выбор вышеописанных красителей семейства флуоресцеина обусловлен возможностью наблюдения постепенного варьирования физико – химических свойств наномаркеров в растворах с и без белка, так как в ряду флуоресцеин – эозин – эритрозин – бенгальский розовый происходит последовательное замещение атомов водорода H атомами галогенов (Br – у эозина), что изменяет электронную и влияет на пространственную структуры, вызывает перераспределение частичных зарядов между атомами и модифицирует другие физические свойства.

§1.4. Флуоресцентная спектроскопия и абсорбционная спектроскопия с применением наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул

Флуоресцентные красители имеют широкий спектр применений в современной биофизике в качестве флуоресцентных зондов, меток, маркеров. Наиболее актуальными являются исследования, связанные с изучением взаимодействия флуоресцентных красителей с биологическими объектами, что зачастую приводит к успешным результатам в биологической диагностике.

Авторами статьи [5] был разработан метод анализа внеклеточных структур ткани на наличие в них альбумина и коллагена с использованием анионного цианинового красителя в качестве флуоресцентного зонда. Серия экспериментов доказывает его высокую результативность.

В работе [6] методами флуоресцентной спектроскопии было изучено взаимодействие нового диоксаборин-триметинового красителя с белками. Результатом их взаимодействия является характерное увеличение испускания красителя. Таким образом, диоксаборин-триметин проявляет себя, как качественный флуоресцентный маркер.

В [7] описан механизм взаимодействия флуоресцентного красителя CFDA SE (CFSE) с клетками крови мышей. Результатом взаимодействия является первоначальное снижение интенсивности флуоресценции красителя и продолжительное стабильное состояние после четырёх часов эксперимента, что позволяет детально изучить исследуемые процессы. Данный метод применим для отслеживания пополнения лейкоцитов крови в ткани, его характерными особенностями является быстрота и относительная простота проведения.

В [8] подробно исследовано взаимодействие стирилцианинового красителя Sbt и его производных с бычьим сывороточным альбумином. При сравнении спектральных характеристик водного раствора данного красителя с и без бычьего сывороточного альбумина было выявлено, что интенсивность флуоресценции увеличивается в 3,5-55 раз при наличии в растворе бычьего сывороточного альбумина. Полученная зависимость константы связи дипольного момента молекул красителя указывает на то, что помимо сил электростатического взаимодействия между молекулами исследуемых красителей и бычьим сывороточным альбумином, важную роль играет гидрофобное взаимодействие.

Авторами [9] разработана новая флуоресцентная полимерная наночастица, синтезированная путём химического сшивания полиакриловой кислоты. Изучено взаимодействие частицы с бычьим сывороточным альбумином. Анализ спектральных данных показывает, что исследуемая наночастица способна мгновенно образовывать обратимое соединение с бычьим сывороточным альбумином в растворе в основном с помощью водородной связи и сил Ван-дер-Ваальса. При наличии в растворе с данным красителем протеина наблюдается значительное увеличение интенсивности флуоресценции наночастицы.

Работа [10] посвящена исследованию взаимодействия флуоресцентного скварейного красителя с сывороточными альбуминами методами флуоресцентной спектроскопии. Результаты исследования показывают, что в

присутствии сывороточных альбуминов человека и быка наблюдается значительное увеличение интенсивности флуоресценции (в 24-190 раз), в то время как в присутствии других альбуминов интенсивность флуоресценции изменяется в гораздо меньшей степени – увеличивается не более, чем в 24 раза.

В работе [11] рассматривается процесс связывания широко используемого в биологических исследованиях флуоресцентного красителя сульфородамина В (SRB) с молекулами сывороточного альбумина человека. Исследования проводятся методом флуоресцентной спектроскопии. Соединение с сывороточным альбумином человека приводит к увеличению интенсивности флуоресценции красителя.

Статья [12] также посвящена изучению скварейна и его модификаций в качестве флуоресцентных маркеров для детектирования альбуминов методами флуоресцентной спектроскопии. Результаты данных исследований схожи с результатами, описанными в [11]. Присутствие в растворе альбуминов влияет на увеличение интенсивности флуоресценции.

Работа [13] посвящена обзору неорганических флуоресцентных зондов и меток, применяемых в клеточной томографии. В статье рассмотрены преимущества данных нано-объектов по сравнению со стандартными флуоресцентными красителями, представлены возможные применения в дальнейших биофизических исследованиях.

В статье [14] авторы затрагивают вопрос стабильности окрашивания флуоресцентными красителями-маркерами нанопереносчиков и приводят методы её проверки. Также рассмотрена диффузия красителей в растворах. Данные исследования, по мнению авторов, сыграют важнейшую роль в дальнейших биологических исследованиях, в том числе и в клеточной томографии.

В работе [15] методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии изучены нековалентные взаимодействия между полиметиновыми красителями различных типов (катионными и анионными

тиакарбоцианинами, анионными оксонолами и тетрацианополиметинами) и сывороточным альбумином человека. Соединение с протеином приводит к сдвигу в длинноволновую область спектра поглощения красителя и, в большинстве случаев, к увеличению квантового выхода флуоресценции.

В статье [16] приведены результаты изучения некоторых аспектов взаимодействия флуоресцентного зонда CAPIDAN с молекулами сывороточного альбумина человека с помощью оптических методов и компьютерного моделирования. Данный краситель широко применяется в качестве детектора структурных изменений в сывороточном альбумине человека при некоторых заболеваниях.

Статья [17] посвящена исследованию процессов взаимодействия между полиметиновыми красителями (PD) и биомакромолекулами. PD проявляет себя как качественный флуоресцентный зонд, благодаря способности красителя образовывать соединения с биомакромолекулами. Также в статье описаны нековалентные взаимодействия полиметиновых красителей с такими макромолекулами, как нуклеиновые кислоты, протеины и др.

В статье [18] спектрально-кинетическими методами флуоресценции изучают волокна амилоидов, ответственных за болезнь Альцгеймера, и описывают процесс взаимодействия красителя Тиофлавин-Г с данным биологическим объектом. Данный краситель используется для детектирования амилоидов. В результате исследований было обнаружено, что две изоформы этих волокон имеют разные структурные и физико-химические характеристики, оценено влияние каждой из них на развитие болезни.

Авторами [19] с помощью явления анизотропии флуоресценции была изучена эффективность связывания двух различных полипептидных лигандов, помеченных флуорофорами, с рецепторами меланокортина 4 (MC₄). Оба вида соединения показывают высокую фотостабильность, слабую чувствительность к параметрам буферного раствора.

Авторами [20] был синтезирован новый триметиновый краситель. Методами флуоресцентной спектроскопии были исследованы его характеристики в свободной форме и при соединении с БСА. В результате показано, что данный краситель может быть использован в качестве наномаркера для изучения биологического материала.

В статье [21] изучено взаимодействие белковых молекул с частицами мезопористого кремния, которые используются в качестве вещества, активно поддерживающего транспорт ферментов. С помощью флуоресцентного метода описываются спектральные характеристики бычьего сывороточного альбумина (используемого в качестве фермента), помеченного наномаркером.

В [22] рассматривают свойства флуоресцентного красителя YOYO (оксазоольный жёлтый гомодимер), применяемого для изучения взаимодействия молекул ДНК и белков в реальном времени методами флуоресцентной спектроскопии.

Цель [23] состояла в изучении переноса энергии в фукоксантин-хлорофиллиным белковым комплексе, соединённым со светособирающим пигмент-белковым комплексом фотосинтетического аппарата, содержащимися в коричневых водорослях. Для этих целей были проанализированы спектры флуоресценции с временным разрешением этих комплексов.

Авторами [24] был разработан метод контролирования процесса формирования наночастиц ZnO с помощью флуоресцентной спектроскопии. Также было показано, что данные, полученные из флуоресцентных спектров, могут быть использованы для изучения размеров подобных наночастиц.

В [25] приведено подробное изучение флуоресцентного нанозонда, синтезированного авторами с целью детектирования ионов Zn^{2+} в водной среде.

Статья [26] посвящена изучению флуоресцентного красителя ADOТА, представляющего собой красный флуорофор, внедрённого в кремниевые и

поливиниловые тонкие плёнки. Флуоресцентные характеристики данного красителя были исследованы методами стационарной и разрешённой по времени флуоресцентной спектроскопии.

В статье [27] изучено взаимодействие флуоресцентного красителя ализарина с белковыми молекулами сывороточного альбумина человека. В результате исследований, проведённых методами стационарной, а также разрешённой по времени флуоресцентной спектроскопии, было показано, что данный краситель является токсичным, так как приводит к дестабилизации белка, выраженной в изменении его структуры.

Работа [28] посвящена сравнению флотабильности двух автофлуоресцентных белков – EGFP и EYFP методами флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Данные белковые молекулы широко используются в биофизических исследованиях.

В работе [29] исследуется возможность использования белка TMBP, помеченного флуоресцентным маркером, в качестве основного компонента для считывающей конструкции современных глюкометров. В серии опытов, проведённых методами флуоресцентной спектроскопии, было выявлено, что флуоресценция помеченного белка изменяется при соединении с глюкозой, что говорит о том, что этот белок подходит для использования в подобных целях.

Авторами [30] было синтезировано легированное празеодимом стекло BiB_3O_6 и изучен ряд его свойств методами стационарной спектроскопии и спектроскопии люминесценции с высоким временным разрешением.

В работе [31] приведены исследования анионного полиметинового красителя, используемого в качестве нанозонда для оценки стабильности коллоидных структур – мицелл. Исследования проводились с применением нескольких методов, в том числе методом стационарной флуоресцентной спектроскопии.

Статья [32] посвящена изучению побочных эффектов, вызванных взаимодействием белков с акриламидом, наиболее часто используемым в

качестве тушителя флуоресценции при исследованиях белковых структур. Подобные взаимодействия зачастую приводят к искажению результатов экспериментов по определению времени жизни флуоресценции.

В работах [33-37] приведены исследования взаимодействия флуоресцентных красителей различных типов с биологическими объектами, включающими в себя белковые молекулы бычьего и человеческого сывороточных альбуминов. Полученные в результате описанных экспериментов данные представляют собой физико-химические параметры и спектрально-кинетические характеристики маркеров, оценки эффективности их связывания с биологическими объектами.

Авторами статьи [38] разработан и описан надёжный метод исследования активности молекулярной машины 26S протеасомы, расположенной в центре системы убиквитин-протеасом, ответственной за регуляцию концентрационных изменений многих белков, на основе измерения анизотропии флуоресценции. Также описаны несколько применений данного метода в формате высокой пропускной способности.

В работе [39] описано создание двухкомпонентного сенсора, синтезированного из белковой молекулы и наночастиц органического красителя, чувствительность которого настраивается изменением соотношения компонентов, для наблюдения мельчайших изменений pH в исследуемой системе. Регулируемый в узком диапазоне значений сенсор был применён для исследования вариаций pH в клетках HeLa с использованием методов флуоресцентной визуализации.

В статье [40] описаны серии синтезированных бета-кетонолов с варьирующимися алкиламиногруппами и исследованы в качестве потенциальных зондов для исследования нерастворимых белковых комплексов – амилоидных фибрил. В зависимости от структуры алкиламиногрупп, интенсивность флуоресценции красителей может возрастать в десятки раз в присутствии инсулиновых фибрил. В работе также исследованы такие характеристики комплексов, содержащих фибрилы, как

квантовый выход флуоресценции, величина константы связывания. Етакотонолы проявляют себя, как перспективные молекулы для флуоресцентного детектирования амилоидных комплексов белков.

Работа [41] посвящена исследованию флуоресцентного красителя BODIPY. Наблюдается существенное увеличение флуоресценции данного наномаркера в присутствии бычьего сывороточного альбумина. При взаимодействии БСА играет роль растворителя для комплексов красителя, помимо традиционной основы для связывания для флуорофора, показывая, что дезагрегирование наномаркера должно быть учтено при оценке взаимодействия пары белок-краситель.

Авторами статьи [42] предложен мультиспектральный подход для одновременного получения инфракрасных, флуоресцентных и спектров рассеяния света белков, претерпевающих объединение. При отдельных спектральных измерениях возникает проблема соотнесения друг с другом различных аспектов процесса агрегации. Данный подход был применён для изучения бета-лактоглобулина, белка, формирующего амилоидные фибриллы при установленных условиях. Результаты мультиспектральных измерений в реальном времени показали, что развёртывание данного белка провоцирует образование ранних комплексов, состоящих из внутримолекулярных бета-листов с поглощением в инфракрасной области.

В работе [43] описано создание наноструктурного самоорганизующегося комплекса для исследования центров связывания и конформационных изменений сывороточного альбумина человека с настраиваемым размером и испусканием. В качестве структурной единицы данного комплекса использован тетрафенилэтиленовый производный краситель TPE-red-COOH. Зарегистрирован высокоспецифичный и чувствительный отклик на САЧ при быстром включении красной флуоресценции и одновременном разупорядочении наноструктур, в то время как эндогенные биомолекулы не могут индуцировать такой отклик. Анализ данного механизма выявил, что комбинация парных нековалентных

взаимодействий является основной причиной разупорядочения и прикрепления TPE-red-COOH к САЧ.

В статье [44] авторами описан яркий красный флуоресцентный индикатор напряжения FlicR1 со свойствами, сравнимыми с распространённым зелёным индикатором. Преимущества красного индикатора состоят в том, что он является менее фототоксичным, имеет меньший автофлуоресцентный фон. Подобного рода индикаторы нашли широкое применение в детектировании активности массива индивидуальных нейронов с широким пространственным и временным разрешением.

Авторами статьи [45] изучено молекулярное взаимодействие между гемоглобином и акридиновым красителем оранжевым (АО) с помощью различных спектроскопических, калориметрических методов и методов молекулярного моделирования. Спектроскопические данные свидетельствуют о том, что белок и краситель образуют энергетически стабильный комплекс. Анализ флуоресцентных спектров в зависимости от температуры говорит об обратно-пропорциональной зависимости устойчивости комплекса от температуры образца и о статической природе тушения флуоресценции. Конформационные изменения белка в комплексе изучены с использованием кругового дихроизма и синхронной флуоресценции. В результате, показано, что небольшие изменения хромофоров акридина приводят к значительным изменениям в структурных и термодинамических аспектах связывания с белком.

Работа [46] посвящена исследованию взаимодействия трифенилметанового красителя кристального фиолетового (КФ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) посредством спектроскопических методов. Статический характер тушения был установлен с помощью флуоресцентных измерений, энергия связи комплекса была определена с помощью спектров в ультрафиолетовом диапазоне. Установлено, что молекулы красителя КФ связываются с под-доменом ПА БСА. Полученные термодинамические характеристики связывания позволяют заключить, что в образовавшемся

комплексе преобладает гидрофобное взаимодействие. С помощью метода кругового дихроизма были изучены конформационные изменения БСА в процессе связывания.

Статья [47] посвящена исследованию взаимодействия между красителем аллюром красным (АК) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) *in vitro* при рН равном 7,4. Вид тушения флуоресценции был определён, как статический, также определена константа связывания в комплексе АК-БСА. Образование комплекса происходит на фоне возрастающей энтропии. Результаты калориметрических измерения также показывают, что имеется вклад энтальпии. Авторами также изучено, что комплекс АК-БСА проявляет поверхностную активность.

Авторами статьи [48] изучены характеристики взаимодействия дикатионных стирилимидазо[1,2-а]пиридиниумных красителей с сывороточным альбумином человека (САЧ) при физиологических условиях посредством флуоресцентной спектроскопии, спектроскопии поглощения в ультрафиолетовой области и кругового дихроизма. Анализ спектров показывает, что механизм тушения флуоресценции САЧ данными красителями является статическим. Вычисленные термодинамические параметры (потенциал Гиббса, энтальпия и энтропия) свидетельствуют о том, что водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса играют ключевую роль в образовании комплексов краситель-белок. Характерные расстояния связей были определены согласно теории безызлучательного переноса энергии Фёрстера. Изучение конформационных изменений САЧ проведено с помощью спектроскопии кругового дироизма.

Работа [49] посвящена изучению применения красителя РВ1 в качестве флуоресцентного наномаркера. В этих целях были изучены его флуоресцентные характеристики в различных растворах. Экспериментальные данные и теоретические расчёты показывают, что РВ1 характеризуется немонотонной сольватохромией, сильно-поляризованно заряженным основным состоянием, большим стоксовым сдвигом и высоким значением

квантового выхода и времени жизни флуоресценции. Взаимодействие данного красителя и конканавалином А было изучено методом спектроскопии кругового дихроизма. Результаты показали, что RB1 является фотостабильным наномаркером с низким значением молекулярной массы, имеющим пик испускания в голубой области спектра.

Авторами работы [50] систематически изучено взаимодействие пиронина Y с сывороточным альбумином человека (САЧ) посредством методов спектроскопии флуоресценции и поглощения, разрешённой по времени флуоресценции, синхронной флуоресценции и метода молекулярного моделирования. Анализ спектров флуоресценции показывает, что пиронин обладает статическим характером тушения флуоресценции при взаимодействии с САЧ. С помощью теории безызлучательного переноса энергии Фёрстера определено характерное расстояние связи пиронина и САЧ: 1,96 нм. Изучение термодинамических свойств связывания белка и красителя показывает, что связь в большей степени обусловлена электростатическим взаимодействием. Также показано, что белок не претерпевает конформационных изменений при взаимодействии пиронином.

Авторами [51] описаны результаты чувствительного и селективного гомогенного иммунологического анализа биомаркера живых раковых клеток альфа-фетопротеина. (АФП) посредством спектроскопии одноволнового возбуждения флуоресценции. Для пометки антител в эксперименте были использованы флуоресцентные квантовые точки CdSe/ZnS и флуорофор Alexa Fluor (AF). Метод был успешно применён для выявления АФП в клинических образцах, результаты согласуются с другими экспериментальными данными.

Статья [52] посвящена изучению механизма взаимодействия пищевого красителя тартразина с гемоглобином человека с помощью спектроскопических и микрокалориметрических методов для выявления его возможной токсичности. Спектры гемоглобина свидетельствуют о гипохромических изменениях в присутствии тартразина. Анализ

спектроскопии разрешённой по времени флуоресценции в зависимости от температуры выявил, что тушение флуоресценции гемоглобина при образовании комплекса с красителем является статическим. Согласно теории безызлучательного переноса энергии Фёрстера было определено расстояние связи: 3,44 нм. Связывание с тартразином приводит к изменению микросреды, окружающей белковый триптофан, что является результатом синхронной флуоресцентной спектроскопии. Присутствие красителя также приводит к конформационным изменениям белка при образовании связи, о чём свидетельствует понижение спиральности гемоглобина.

Авторами работы [53] изучены параметры связывания красителя СЗГ с тремя белковыми молекулами: бычьим сывороточным альбумином (БСА), гемоглобином (Гб) и миоглобином (Мб) с помощью спектроскопических методов и молекулярного моделирования. Флуоресцентные измерения, в том числе и разрешённые по времени, показывают, что СЗГ тушит флуоресценцию каждого из белков статическим методом, и позволяют определить величины констант связывания. Выявленные величины термодинамических параметров позволяют определить, что процесс образование комплекса белок-краситель обусловлен в большей степени водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса. Исследование кругового дихроизма и ультрафиолетовой флуоресценции показывает, что вторичная структура белков частично разрушается в присутствии красителя.

Работа [54] посвящена изучению нового синтезированного нецентральносимметричного комплекса РКА, относящегося к группе халконов и имеющего потенциал, как флуоресцентного красителя для биологических исследований. Для этой цели исследованы линейные и нелинейные свойства данного красителя в растворах различной полярности. Результаты эксперимента с использованием флуоресцентной спектроскопии выявили, что РКА обладает сильным поглощением, большой величиной стоксового сдвига, относительно высоким квантовым выходом флуоресценции и высоким нелинейным оптическим откликом.

Авторами [55] описан новый синтезированный краситель, созданный для изучения структуры белков. В статье описано изучение фотофизических свойств красителя в различных растворах. Экспериментальные данные показывают высокую величину стоксового сдвига и квантового выхода флуоресценции данного наномаркера в органических растворах. Также экспериментально были подтверждены фотостабильность и термостабильность красителя. Методами спектроскопии флуоресценции и поглощения было изучено взаимодействие красителя с бычьим сывороточным альбумином (БСА) и сывороточным альбумином человека (САЧ). Вычисленные константы связывания позволяют утверждать, что данный краситель является подходящим флуоресцентным биомаркером.

Работа [56] посвящена исследованию взаимодействия двух красителей: кислотного красного (КК) и кислотного зелёного (КЗ) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) посредством спектроскопии флуоресценции и ультрафиолетового поглощения. Результаты показывают, что механизм тушения флуоресценции комплекса белок-краситель является статическим для каждого из исследуемых наномаркеров, однако связь КК с белком является сильнее, чем связь КЗ с под-доменом ПА БСА. С помощью метода Дебая-Хюккеля были определены величины констант связывания, изменения потенциала Гиббса и эффективный заряд в анионной зоне белка.

Статья [57] посвящена изучению фотофизических свойств синтезированного чувствительного асимметричного цианинового красителя, имеющего пик свечения в ближней инфракрасной зоне. Изучено взаимодействие данного красителя с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Согласно экспериментальным данным, взаимодействие белка и красителя приводит не только к возрастанию интенсивности свечения, но также к смещению максимума поглощения в результате образование комплекса краситель-белок.

В статье [58] описан синтез и применение новой флуоресцентной молекулы SQ1 на основе скварена в качестве флуоресцентного биомаркера.

Для этих целей проведён анализ взаимодействия SQ1 с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Исследование основано на результатах спектроскопии флуоресценции и поглощения в ультрафиолетовой области. Анализ связывания красителя и белка с применением специальных зондов показывает, что наномаркер присоединяется к связывающему центру I БСА. Комплекс AQ1-БСА используется для изучения биологических процессов методом флуоресцентной визуализации.

В работе [59] описывается новый ратиометрический метод для количественного анализа показателя pH внутри живой клетки. Структура наносенсора включает в себя матрицу бычьего сывороточного альбумина (БСА) и реагирующий на изменение pH флуоресцентный краситель Alexa 594, позволяющий делать количественные измерения. Потенциал данного комплекса был опробован на живых клетках HeLa. Значительное изменение величины интенсивности флуоресценции было обнаружено, когда pH клетки был изменен с нормального на более кислотный. Также наносенсор показал быстрый отклик на изменение pH, что делает его сильным инструментом для исследования биологических процессов.

Авторами [60] представлено первое, на их взгляд, применение индуцированной циркулярно-поляризованной люминесценции для исследования связи флуоресцентных красителей с молекулой ДНК. Метод опробован на красителе тиазол оранжевый (ТО). Метод показал хорошие результаты, но его недостаток заключается в необходимости отделять экспериментальные результаты, вызванные компонентами с линейной поляризацией.

Работа [61] посвящена изучению фотофизических свойств флуоресцентных красителей на основе красителя BODIPY в системах, содержащих биомолекулы плазмы крови, в частности, бычий сывороточный альбумин (БСА). Основными методами исследования являются спектроскопия флуоресценции и поглощения. Взаимодействие данных красителей с белками приводит к изменению спектральных характеристик

наномаркера, в том числе смещению пика поглощения и изменению интенсивности испускания. Механизм изменения флуоресцентных характеристик был изучен посредством теории Штерна-Фольмера. Впервые было обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции фенил-замещённого BODIPY в присутствии белков, вызванное резонансным переносом энергии и изменением физико-химических свойств молекулярной среды.

В работе [62] изучается взаимодействие лекарственного препарата фексофенадина с бычьим сывороточным альбумином (БСА) посредством флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии поглощения в ультрафиолетовой области при физиологических условиях. Графики Штерна-Фольмера при разных температурах и флуоресценция равновесного состояния позволяют определить статический тип взаимодействия молекул. Также определены константы связывания образцов. В результате эксперимента выявлено, что фексофенадин связывается преимущественно со связывающим сайтом I БСА посредством водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса.

Работа [63] посвящена изучению образования комплекса флуорофора Atto и полимером полиэтилен гликоль (ПЭГ). Данный флуорофор нашёл широкое применение в области визуализации ввиду долгого времени жизни, высокого значения квантового выхода и высокой чувствительности к изменению в окружающей среде. ПЭГ, в свою очередь, используется в биомедицине в качестве доставщика лекарств и тканевой инженерии. Авторы используют корреляционную флуоресцентную спектроскопию для изучения механизма связывания. Выявлено, что связь обусловлена преимущественно образованием водородной связи между исследуемыми молекулами.

Авторами [64] проведены исследования взаимодействия двух фенотиазиновых красителей: тионина и толюидина синего с тремя двойными молекулами РНК с использованием спектроскопических методов. Взаимодействие с РНК вызывает тушение флуоресценции красителей,

имеющее статический механизм, что подтверждается исследованием анизотропии поляризованной флуоресценции. Также результаты спектроскопии кругового дихроизма выявляют, что связывание с красителями приводит к структурным изменениям в молекуле РНК. Процесс связывания сопровождается отрицательным изменением энтальпии и минимальным положительным изменением энтропии.

Интерес к применению флуоресцентных красителей (зондов, наномаркеров) неслучаен. Флуорофоры позволяют изучать биологические объекты, выявлять изменения в структуре клеток, тканей, компонент крови исследуемого образца. Методы исследования флуоресценции конкретных веществ обладают высокой чувствительностью, а также удобным временным диапазоном. За это время происходит множество различных молекулярных процессов, которые влияют на спектральные характеристики флуоресцирующего соединения. Исследование флуоресценции позволяет получить информацию о состоянии живых систем, не повреждая их, и не требует большого количества биологического материала. Имея такие преимущества, флуоресцентные методы позволяют просто и экономично решить многие задачи клинической диагностики, экологического контроля и физико-химического анализа и все шире применяются в медицинских и биохимических исследованиях.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и наномаркеров

Для исследования флуоресцентных и кинетических характеристик красителя эозина и его взаимодействия с бычьим сывороточным альбумином были приготовлены буферные растворы:

- 1) 0,1 М CH_3COOH – 0,1 М KOH , pH (3,5 – 5,0)

2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH , рН (6,0 – 8,0)

и растворы 150 мкМ бычьего сывороточного альбумина (БСА)

На их основе были приготовлены растворы наномаркера эозина со значениями концентрации 30; 50 мкМ с различными значениями рН (3,5 – 8,0).

Для исследования влияния белка на спектрально-люминесцентные характеристики в растворы с наномаркером (30; 50 мкМ) добавляли бычий сывороточный альбумин БСА концентрации (150 мкМ) при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

§2.2. Методика экспериментов для исследования спектров поглощения красителей в растворах бычьего сывороточного альбумина с различными значениями рН

Исследование спектров поглощения наномаркера эозина в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ) и в растворах без белка с различными значениями рН (3,5 – 8,0) и при разных концентрациях наномаркеров (30мкМ, 50мкМ) проводились с помощью спектрофотометра Lambda 35 (Perkin Elmer). Схема оптического пути в приборе представлена на Рисунке 4.

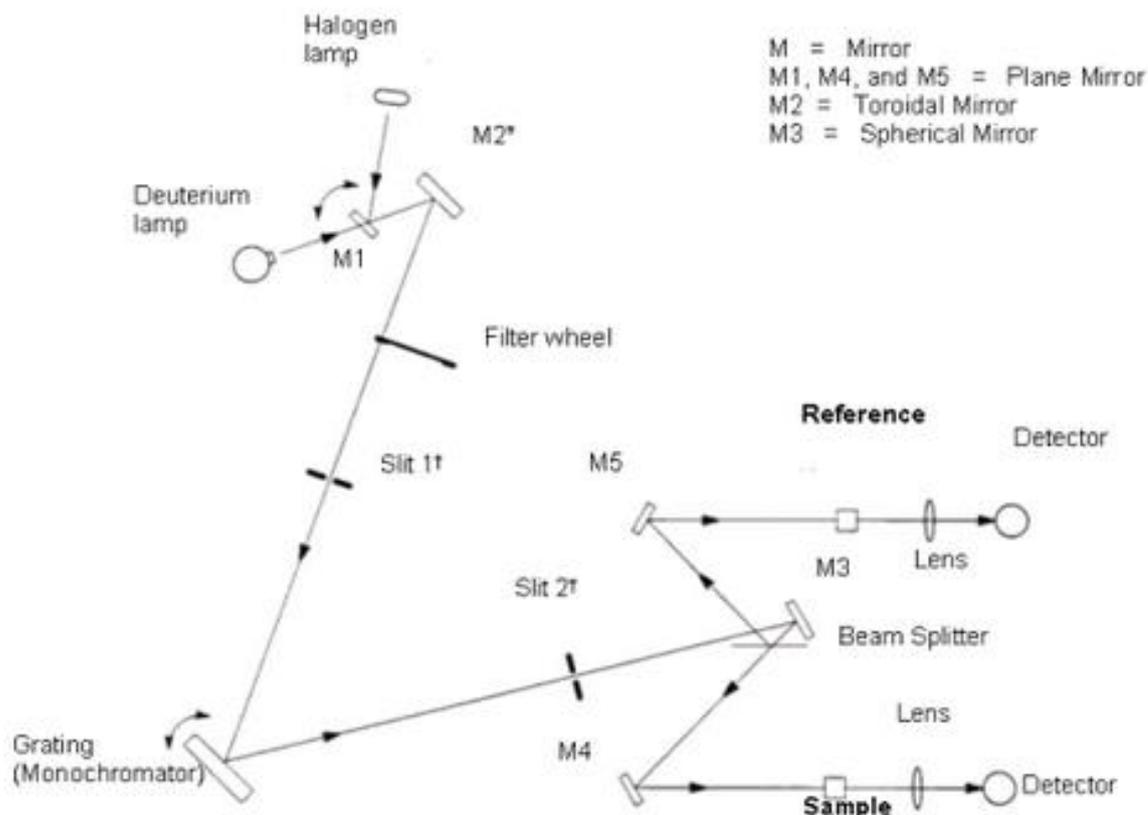
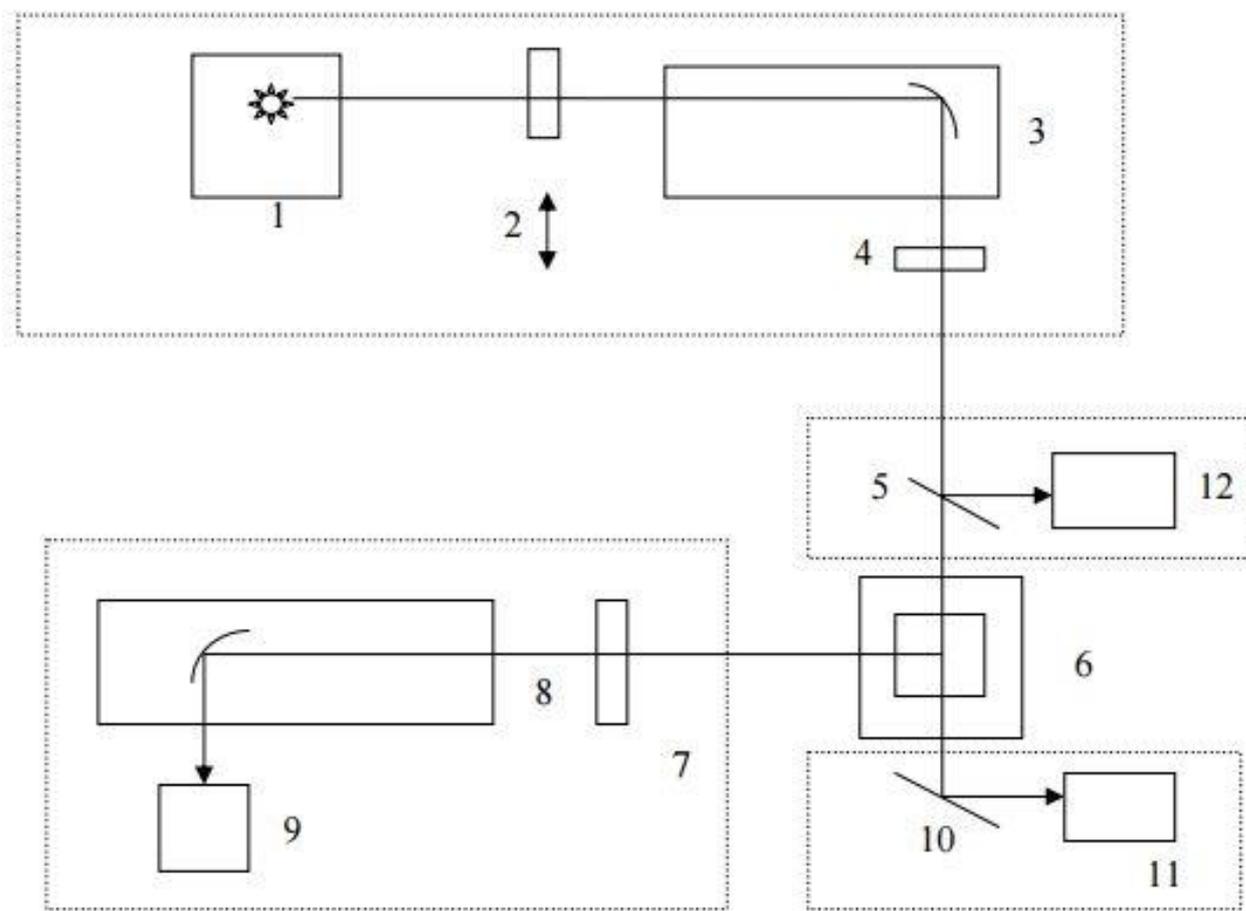


Рисунок 4. Оптический путь в спектрометре Lambda 35.

Область регистрации спектров поглощения 350 – 650 нм. Образцы при измерении помещались в кювету при комнатной температуре.

§2.3. Методика экспериментов для исследования зависимости спектров поглощения красителя в растворах бычьего сывороточного альбумина от температуры с различными значениями pH

Исследование спектров поглощения наномаркера эозина в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ) и в растворах без белка с различными значениями pH (3,5 – 8,0) и при разных концентрациях наномаркера (30мкМ, 50мкМ) проводились с помощью спектрофотометра Флюорат-02-Панорама с температурной приставкой. Оптическая схема прибора представлена на Рисунке 5



- 1 - источник излучения
- 2 - устройство отсеки второго порядка дифракции
- 3 - монохроматор осветительного канала (возбуждения)
- 4 и 7 - светофильтры каналов возбуждения и регистрации люминесценции
- 5 и 10 - светоделительные пластины
- 6 - кювета с анализируемой пробой
- 8 - монохроматор флюориметрического канала
- 9 - фотоприёмник флюориметрического канала (ФЭУ)
- 11 - фотоприёмник канала пропускания (фотометрического)
- 12 - фотоприёмник опорного канала

Рисунок 5. Оптическая схема спектрофлуориметрического анализатора «ФЛУОРАТ-02».

Измерения спектров проводились при температурах 25-45⁰С с шагом в 5⁰С. При температурах выше происходила денатурация белка БСА, раствор менял свои оптические свойства.

Глава 3. Исследование спектров поглощения и флуоресценции флуоресцентного маркера в растворах бычьего сывороточного альбумина (собственные результаты и их обсуждение)

§3.1. Спектры поглощения и степень ассоциации растворов эозина, содержащих и не содержащих БСА

В ходе проведения эксперимента были получены и проанализированы спектры поглощения растворов наномаркера различных концентраций в растворах с БСА и буферных растворах при вариации рН (от 3,5 до 8,0) и определены степени ассоциации эозина. Для всех полученных спектров поглощения красителя эозина, как в растворах без альбумина, так и в растворах с ним, было обнаружено два максимума поглощения (коротковолнового максимума, характеризующего наличие ассоциатов флуоресцентного маркера в растворе, и длинноволнового максимума, соответствующего мономерам исследуемого зонда).

Выделение спектров мономеров и димеров осуществлялось путем выделения из суммарного спектра гауссовых компонент с помощью программы OriginPro 9.0 (OriginLab Corp.).

Доля мономеров X в исследованных растворах определялась как отношение $S_{\text{погл}}^{\text{M}}/S_{\text{погл}}^{\text{раст}}$, где $S_{\text{погл}}^{\text{M}}$ - площадь спектра поглощения мономеров, $S_{\text{погл}}^{\text{раст}}$ - площадь спектра поглощения раствора. При этом степень ассоциации равна $1-X$.

На Рисунках б[а-г] представлены спектры поглощения растворов красителя концентрации 30 мкМ и 50 мкМ, с БСА и без белка.

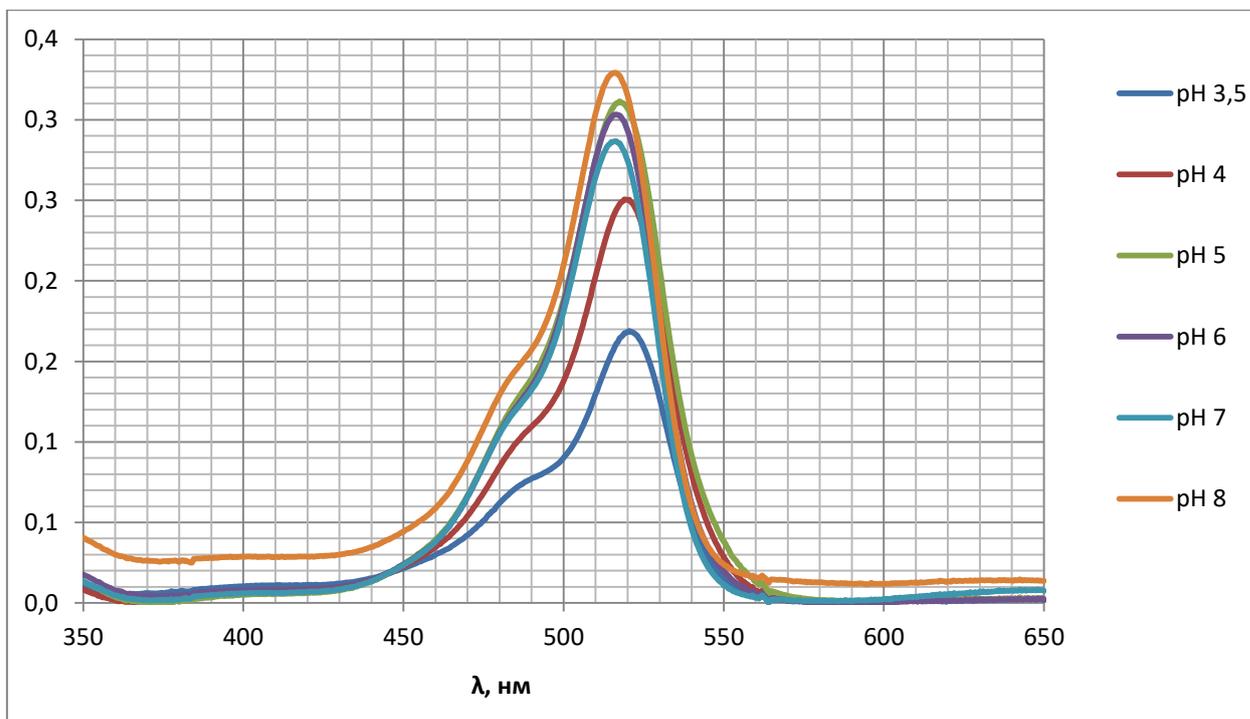


Рисунок 6а. Спектры поглощения растворов эозина (30 мкМ), не содержащих БСА, при различных значениях pH (3,5 – 8)

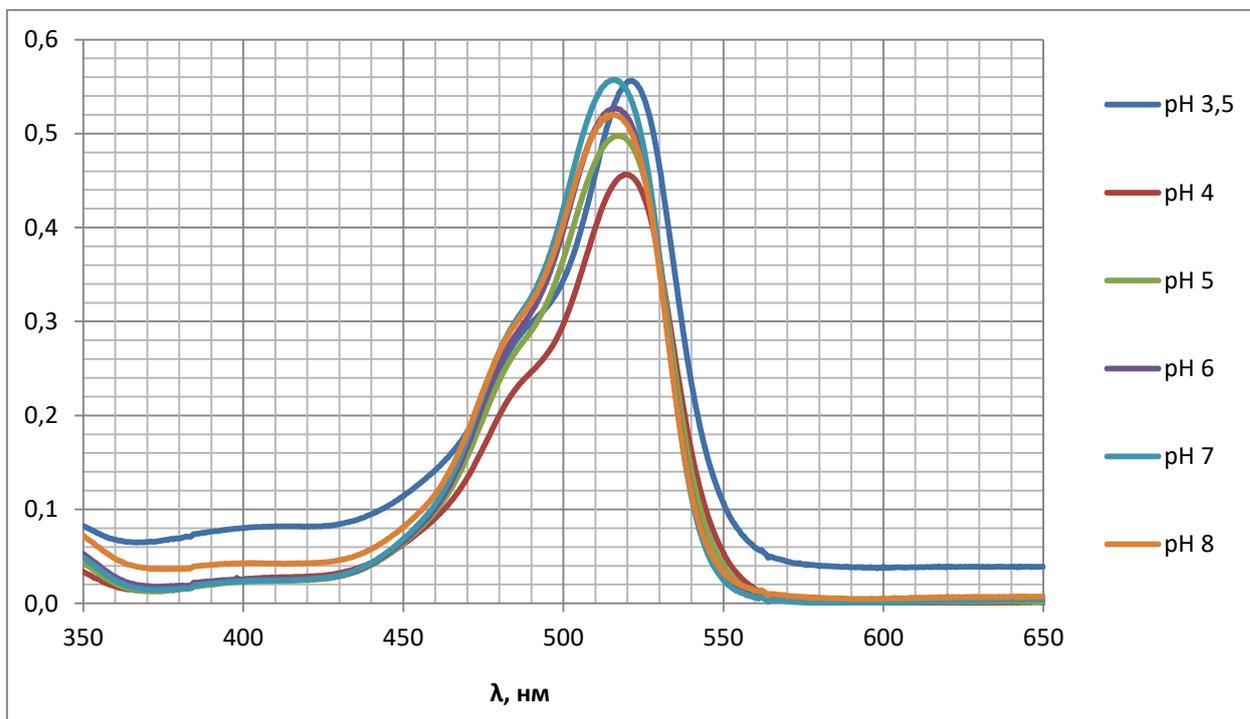


Рисунок 6б. Спектры поглощения растворов эозина (50 мкМ), не содержащих БСА, при различных значениях pH (3,5 – 8)

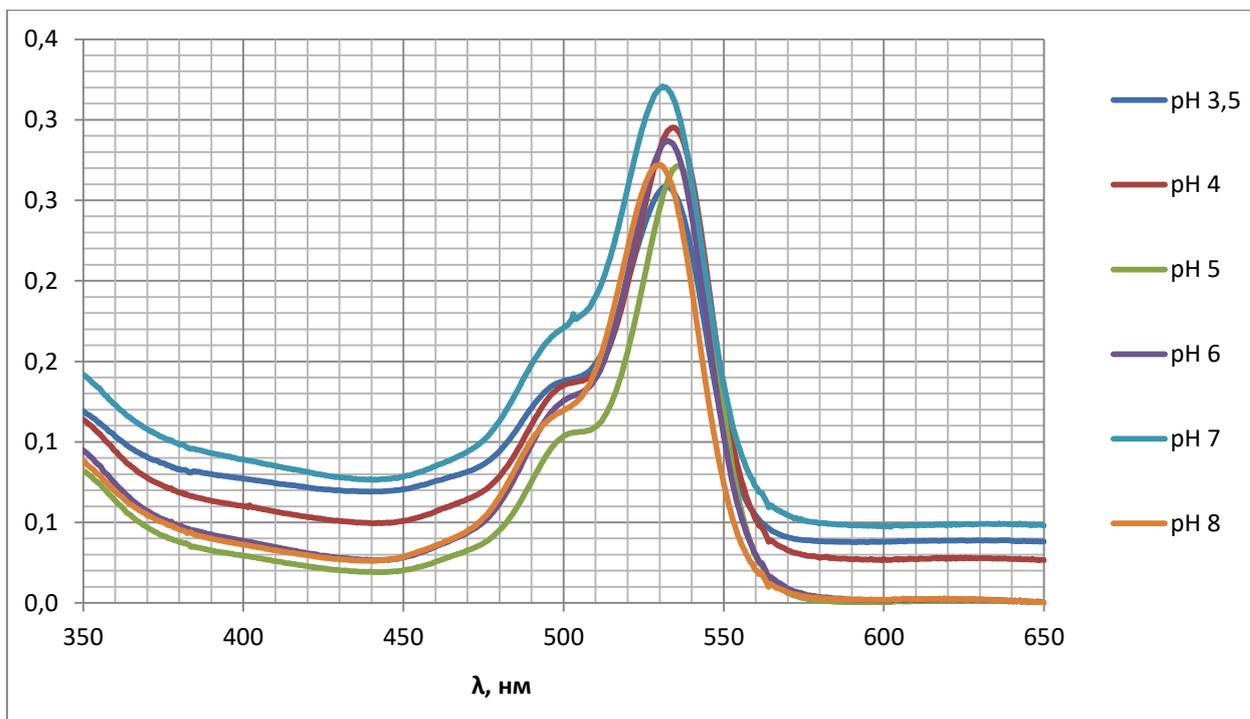


Рисунок бв. Спектры поглощения растворов эозина (30 мкМ), содержащих БСА, при различных значениях рН (3,5 – 8)

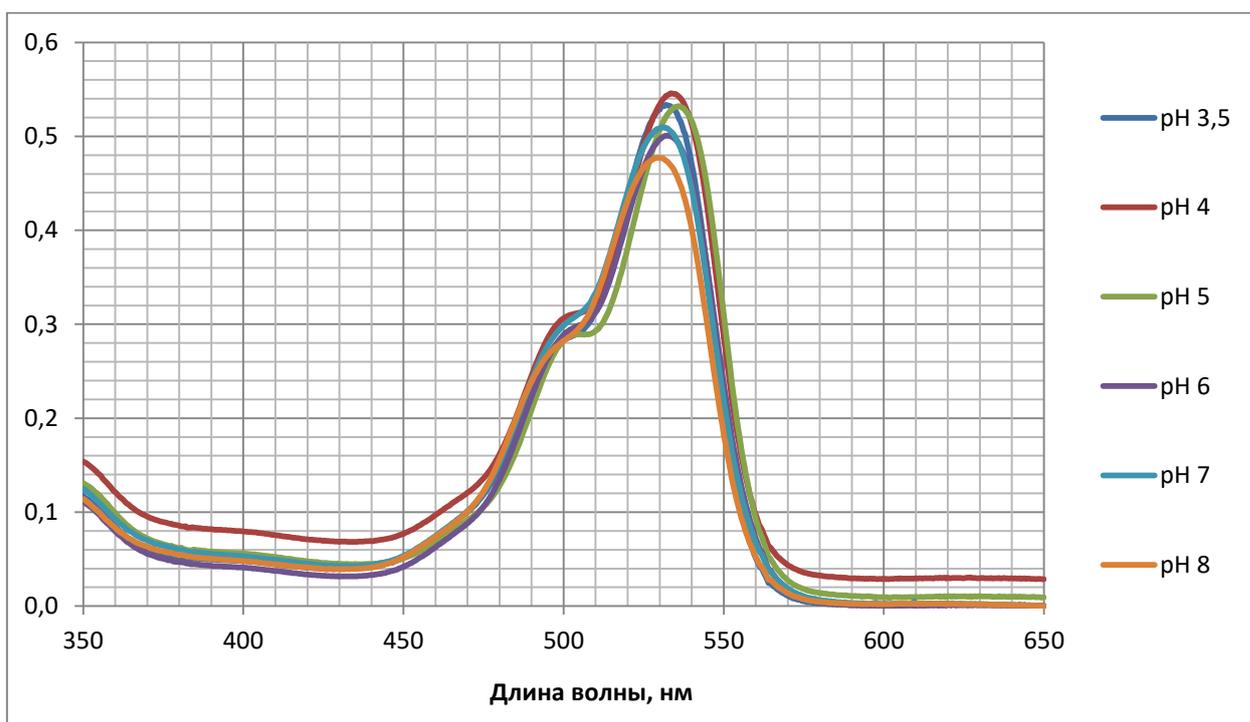
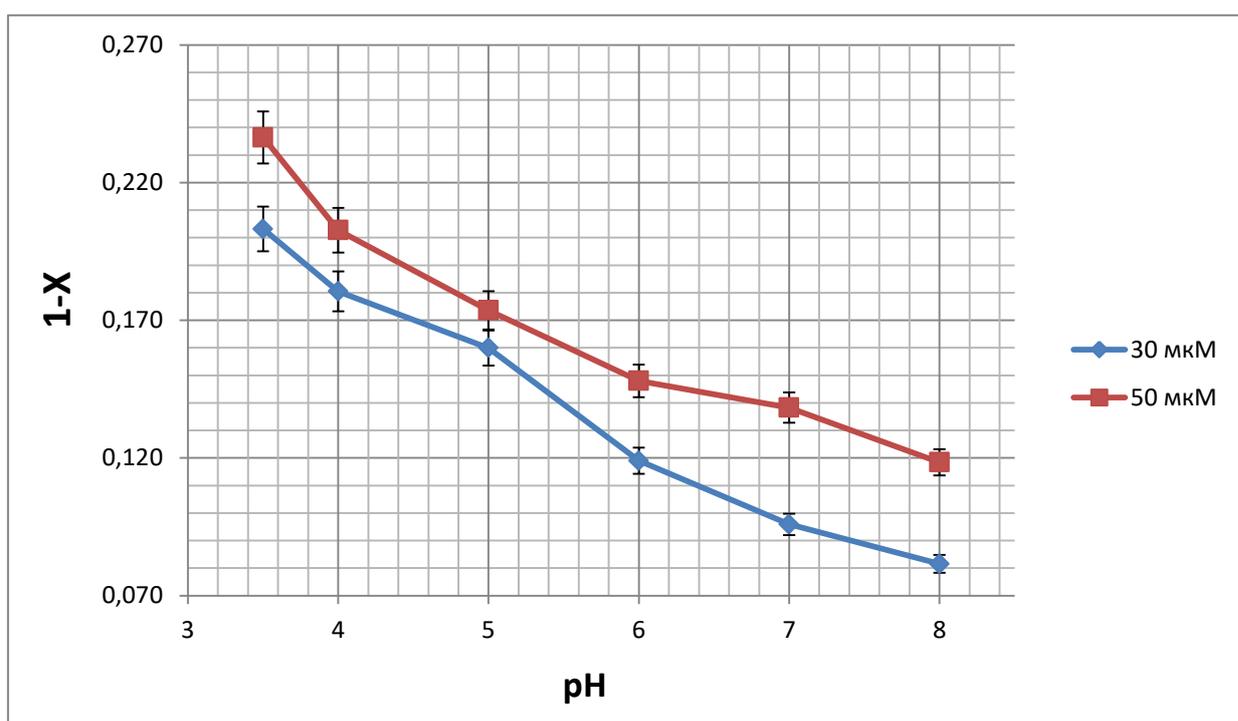


Рисунок бг. Спектры поглощения растворов эозина (50 мкМ), содержащих БСА, при различных значениях рН (3,5 – 8)

При добавлении в буферные растворы молекул БСА наблюдается изменения степени ассоциации красителя. На Таблице 1 и Рисунках 7[а,б] представлены зависимости $(1-X)$ от рН для эозина в буферных растворах и растворах белков. Это изменение различно для различных концентраций красителей.

рН	1-X			
	без БСА		с БСА	
	30 мкМ	50 мкМ	30 мкМ + БСА	50 мкМ + БСА
3,5	0,203	0,236	0,148	0,159
4	0,180	0,203	0,136	0,151
5	0,160	0,174	0,112	0,125
6	0,119	0,148	0,095	0,104
7	0,096	0,138	0,078	0,099
8	0,082	0,118	0,072	0,087

Таблица 1. Зависимость степени ассоциации $(1-X)$ растворов эозина, содержащих и не содержащих БСА от рН (3,5 -8)



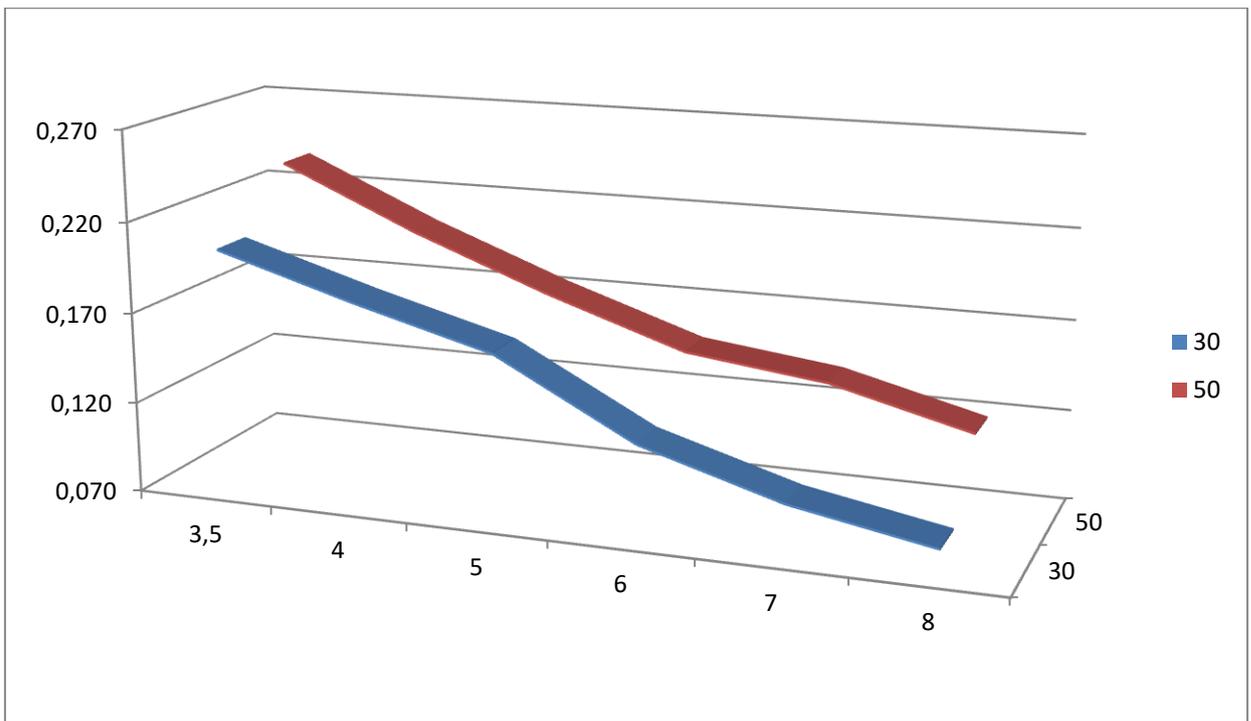
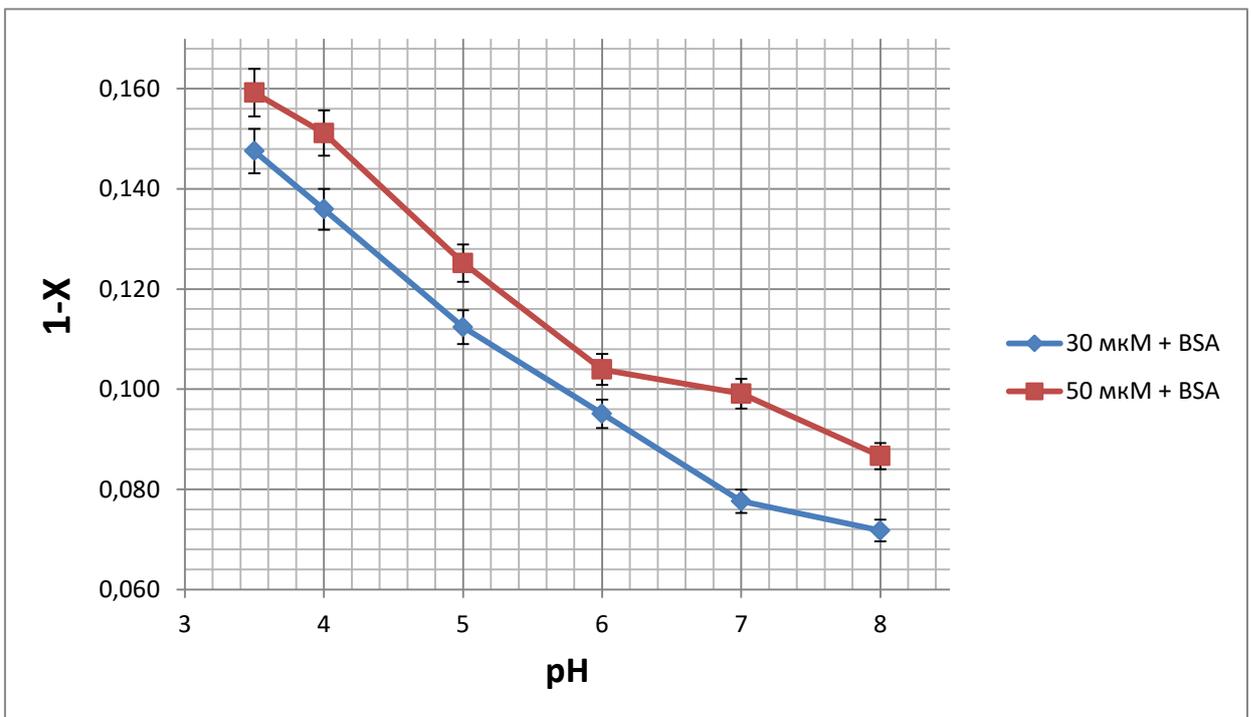


Рисунок 7а. Зависимость степени ассоциации (1-X) растворов эозина, не содержащих БСА от pH (3,5 -8)



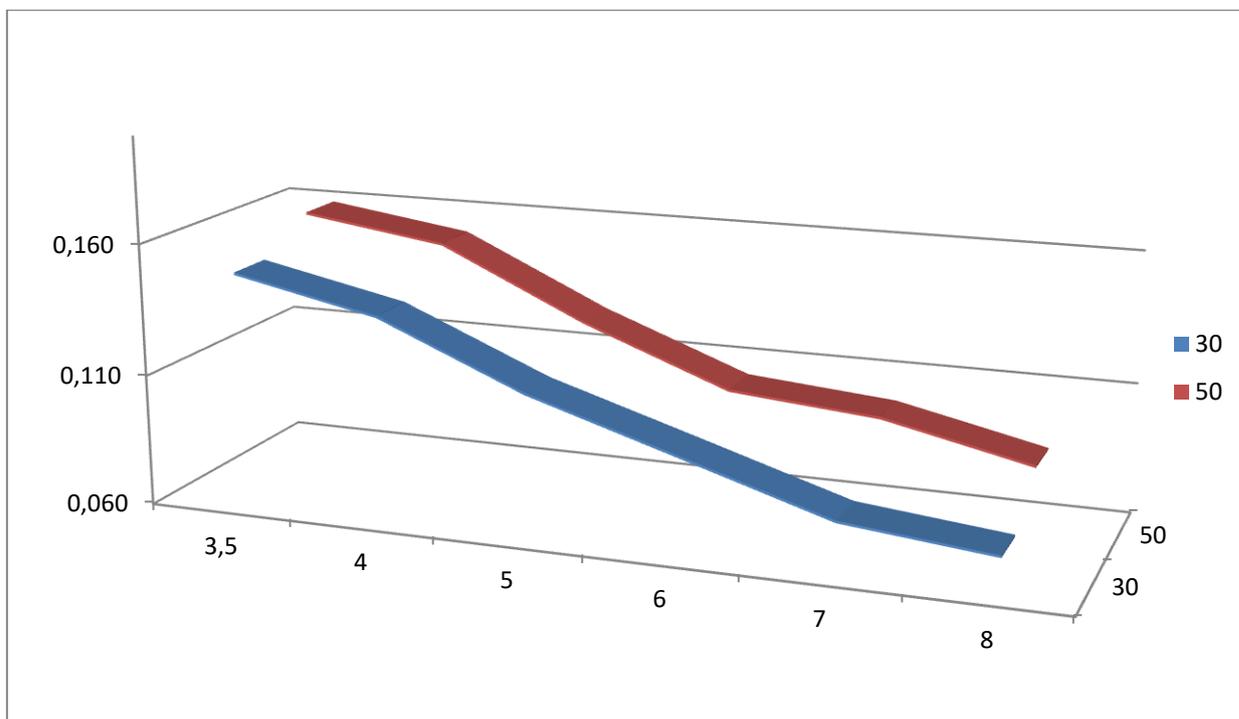


Рисунок 7б. Зависимость степени ассоциации (1-X) растворов эозина, содержащих БСА от рН (3,5 -8)

С увеличением значений рН возрастает отрицательный заряд эозина, и его усиливающееся взаимное отталкивание препятствует образованию ассоциатов. При значениях $pH < 3,0$ наномаркер эозин электрически нейтрален, при $3,0 < pH < 5,0$ он находится в слабо отрицательно заряженной форме (моноанион). При рН выше 5,0 эозин является дианионом и заряжен сильно отрицательно.

Также видно, что степень ассоциации молекул эозина, как в растворах без белка, так и в растворах с БСА, возрастает с увеличением концентрации красителя. Из сравнения графиков видно, что степень ассоциации молекул эозина в растворах БСА меньше степени ассоциации молекул эозина в растворах без белка при соответствующих значениях рН и соответствующих концентрациях эозина, что объясняется связыванием эозина с молекулами БСА и, соответственно, уменьшением доли несвязанных с белком молекул эозина, способных к образованию ассоциатов.

Также были получены и проанализированы спектры поглощения растворов наномаркера эозина различных концентраций в растворах с БСА и буферных растворах при различных рН (от 3,5 до 8,0) в зависимости от температуры образца (от 25 до 45 градусов Цельсия с шагом в 5 градусов) и определены степени ассоциации. Как и в предыдущем случае, степени ассоциации определялась из соотношения площадей пиков, отвечающих за поглощение димеров (ассоциатов) и мономеров. При дальнейшем повышении температуры белок денатурирует и теряет свои оптические свойства. На Рисунках 8[а-г] представлены спектры поглощения растворов эозина с БСА и без белка при различных значениях температуры образца (на примере раствора с фиксированным значением рН буфера равным 7,0).

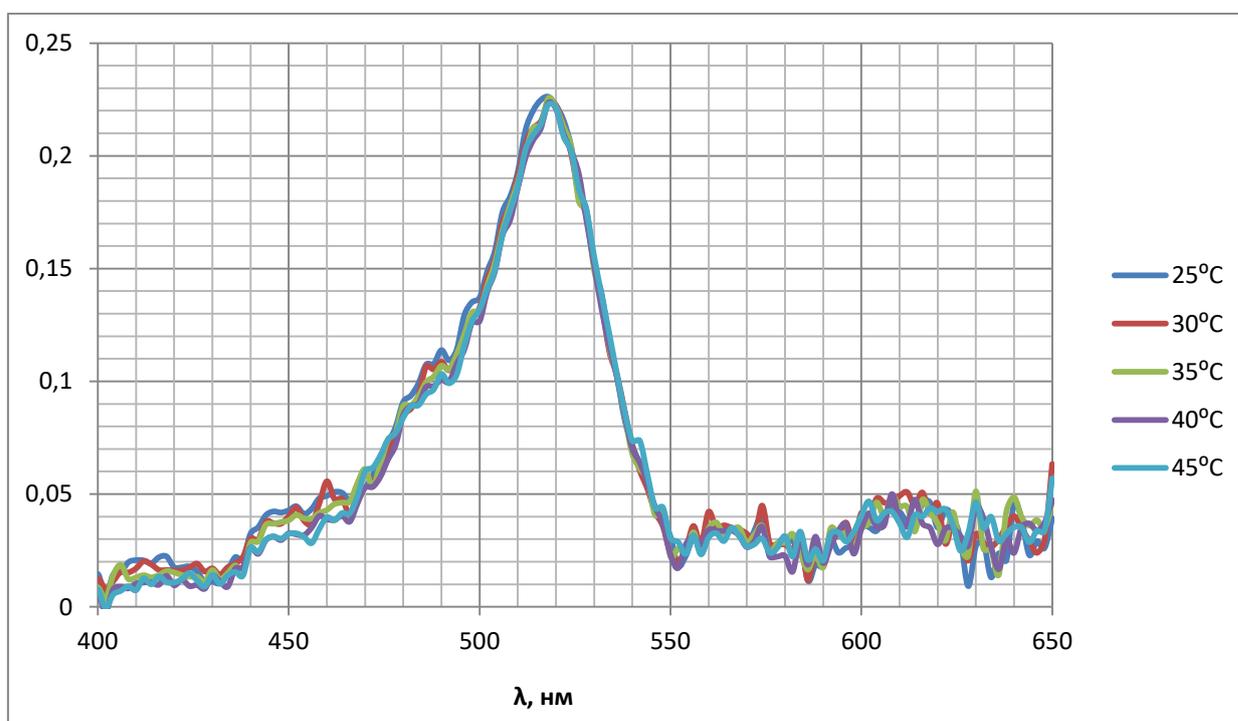


Рисунок 8а. Спектры поглощения растворов эозина (30 мкМ), не содержащих БСА, при различных значениях температуры (25 – 45 градусов Цельсия)

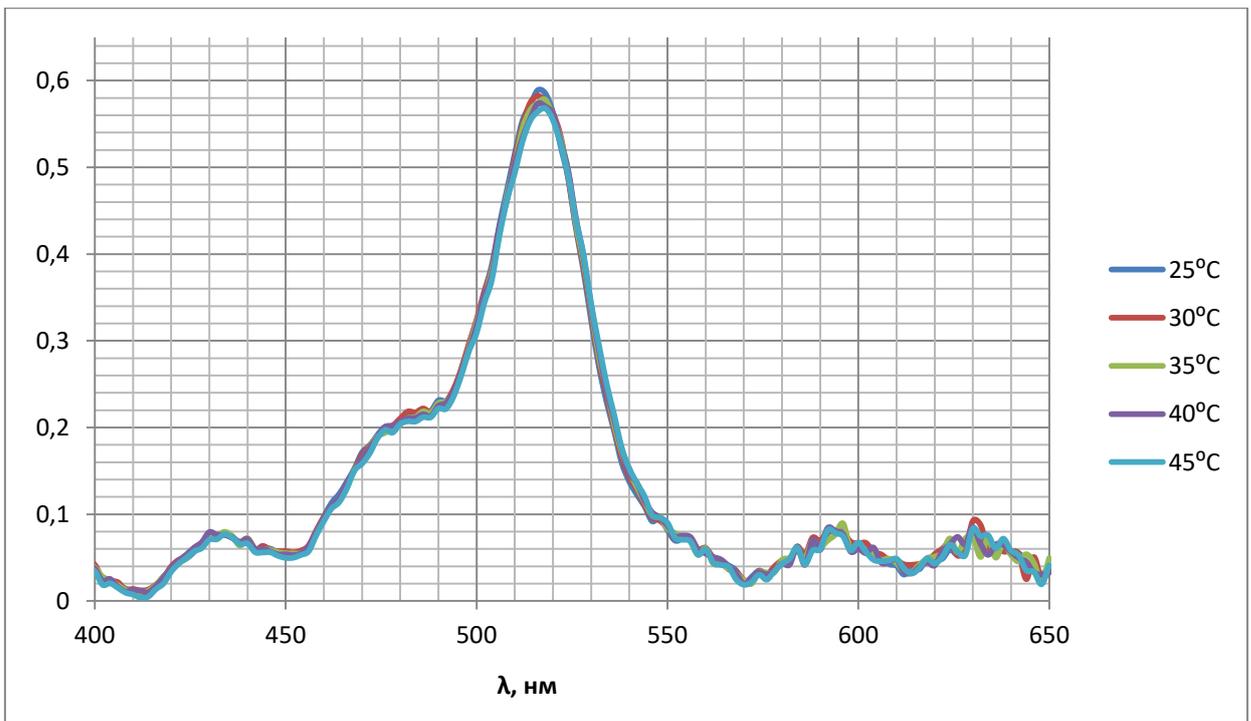


Рисунок 8б. Спектры поглощения растворов эозина (50 мкМ), не содержащих БСА, при различных значениях температуры (25 – 45 градусов Цельсия)

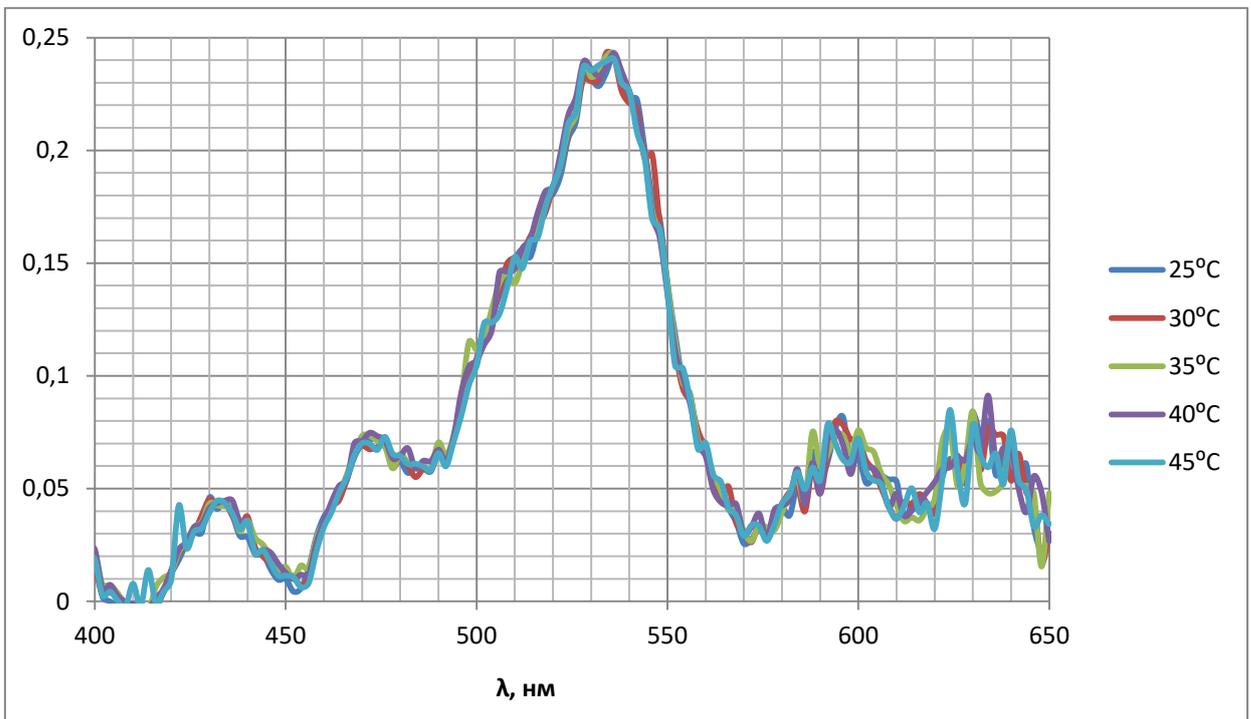


Рисунок 8в. Спектры поглощения растворов эозина (30 мкМ), содержащих БСА, при различных значениях температуры (25 – 45 градусов Цельсия)

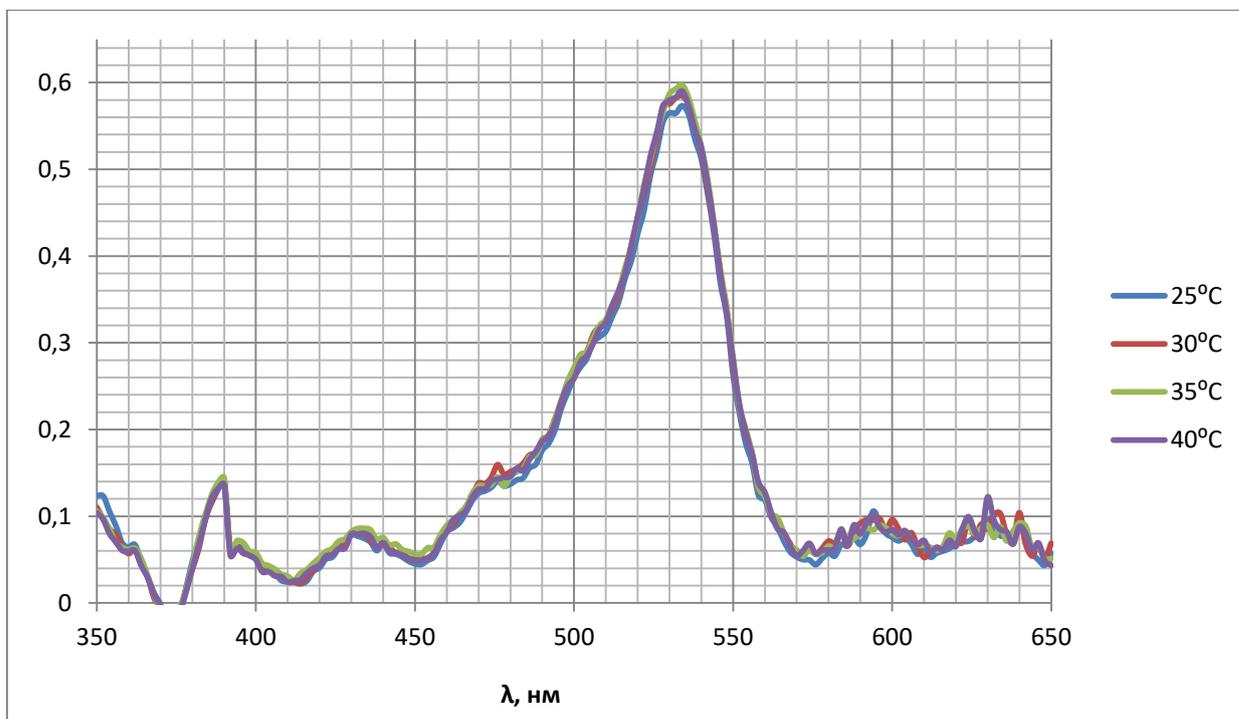


Рисунок 8г. Спектры поглощения растворов эозина (50 мкМ), содержащих БСА, при различных значениях температуры (25 – 45 градусов Цельсия)

При изменении температуры раствора наблюдается изменения степени ассоциации. На Таблицах 2[а-г] представлены зависимости (1-X) для эозина в буферных растворах и растворах белков от температуры.

30 мкМ	рН	1-X					
		3,5	4	5	6	7	8
	Т, °С						
	25	0,201	0,18	0,162	0,118	0,093	0,085
	30	0,186	0,161	0,148	0,104	0,065	0,071
	35	0,172	0,147	0,13	0,089	0,058	0,052
	40	0,156	0,133	0,114	0,070	0,030	0,037
	45	0,137	0,117	0,101	0,054	0,026	0,021

Таблица 2а. Зависимость степени ассоциации (1-X) растворов эозина (30 мкМ), не содержащих БСА при различных значениях рН (3,5 -8) от температуры (25-45 градусов Цельсия)

50 мкМ	pH	1-X					
		3,5	4	5	6	7	8
	T, °C						
	25	0,237	0,202	0,174	0,148	0,138	0,118
	30	0,213	0,182	0,152	0,123	0,115	0,099
	35	0,193	0,161	0,132	0,104	0,096	0,076
	40	0,182	0,138	0,114	0,080	0,076	0,056
45	0,140	0,120	0,095	0,070	0,055	0,039	

Таблица 2б. Зависимость степени ассоциации (1-X) растворов эозина (50 мкМ), не содержащих БСА при различных значениях pH (3,5 -8) от температуры (25-45 градусов Цельсия)

30 мкМ	pH	1-X					
		3,5	4	5	6	7	8
	T, °C						
	25	0,144	0,136	0,115	0,085	0,076	0,076
	30	0,129	0,12	0,102	0,071	0,066	0,069
	35	0,116	0,105	0,09	0,058	0,055	0,056
	40	0,105	0,092	0,075	0,047	0,043	0,041
45	0,094	0,085	0,059	0,037	0,030	0,029	

Таблица 2в. Зависимость степени ассоциации (1-X) растворов эозина (30 мкМ), содержащих БСА при различных значениях pH (3,5 -8) от температуры (25-45 градусов Цельсия)

50 мкМ	pH	1-X					
		3,5	4	5	6	7	8
	T, °C						
	25	0,160	0,152	0,124	0,104	0,098	0,087
	30	0,137	0,132	0,101	0,083	0,076	0,067
	35	0,118	0,119	0,082	0,063	0,057	0,047
	40	0,100	0,102	0,068	0,045	0,037	0,030
45	0,079	0,083	0,040	0,024	0,020	0,014	

Таблица 2г. Зависимость степени ассоциации (I-X) растворов эозина (50 мкМ), содержащих БСА при различных значениях рН (3,5 -8) от температуры (25-45 градусов Цельсия)

Для исследования зависимости степени ассоциации растворов маркера от температуры были построены кривые, отображающие данную зависимость для каждого значения рН буферного раствора при различных концентрациях красителя, а также для растворов содержащих и не содержащих БСА. В качестве примера на рисунке 9 представлено семейство графиков зависимости степени ассоциации раствора от температуры для растворов с рН равным 7,0.

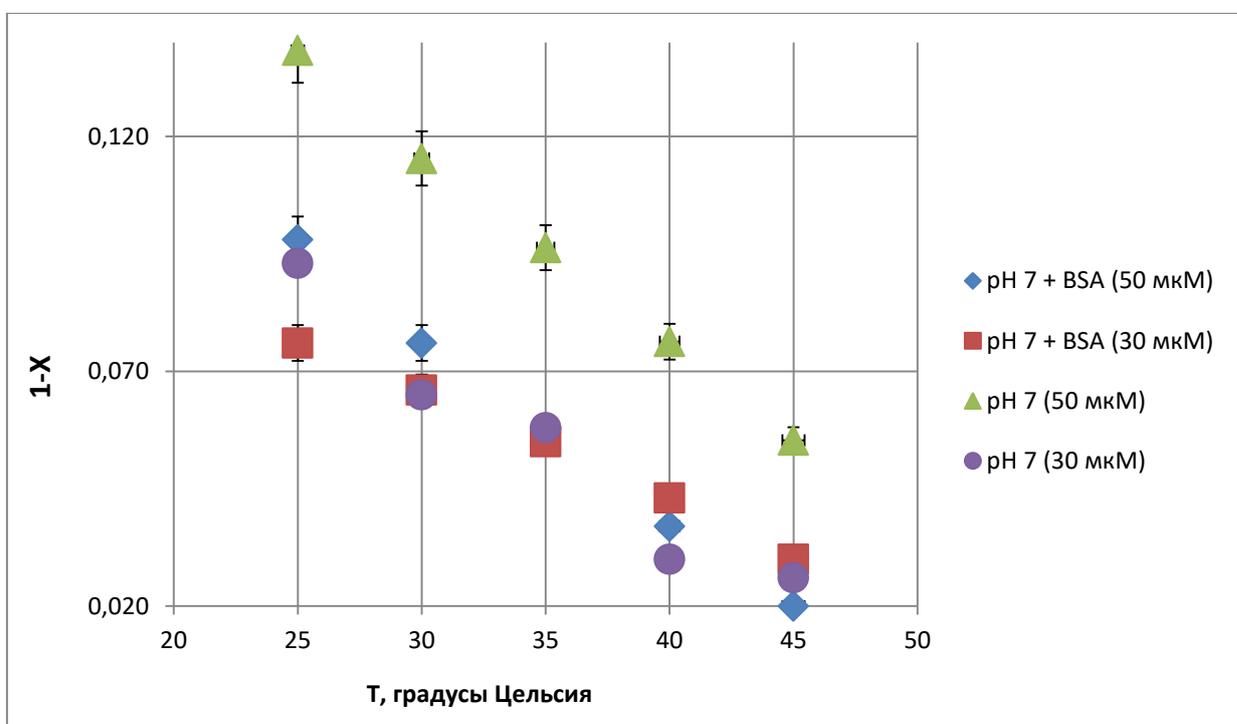


Рисунок 9. Зависимость степени ассоциации (I-X) растворов эозина, содержащих и не содержащих при фиксированном значении рН равном 7 БСА от температуры (25-45 градусов Цельсия)

Из зависимостей, проиллюстрированных на графиках видно, что при увеличении температуры степень ассоциации димеров в растворах монотонно уменьшается. Рост температуры препятствует процессу

димеризации молекул красителя в растворе. При дальнейшем увеличении температуры белок денатурирует.

§3.2. Энергетические характеристики эозина в растворах БСА

Энергетические характеристики взаимодействия молекул флуоресцентного наномаркера эозина также зависят от рН буфера и добавления в раствор молекул БСА [49; 51; 53; 54; 57; 63]. Полученные значения степеней ассоциации растворов в зависимости от температуры образца используются для расчёта энергии связи ассоциатов в растворе из термодинамических соображений:

$$\Delta G = -TR \ln K, \quad (21)$$

где ΔG – потенциал Гиббса; R – универсальная газовая постоянная;

K – константа равновесия

$$\ln K = -\frac{\Delta G}{TR} \quad (22)$$

Выражение для потенциала Гиббса:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (23)$$

Подставляя (3.2.3) в (3.2.2), получим уравнение Вант Хоффа:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (24)$$

ΔH – энтальпия диссоциации, характеризующая энергию связи ассоциированных молекул красителя, ΔS – энтропия.

Энергия связи $U = \Delta H$ определяется методом наименьших квадратов из линейного уравнения (24). Для этого необходимо построить прямую, отображающую зависимость $R\ln K$ от обратной температуры, и вычислить

коэффициент её наклона к горизонтальной оси. На Рисунке 10 проиллюстрирован вид зависимости $R \cdot \ln K$ от обратной температуры.

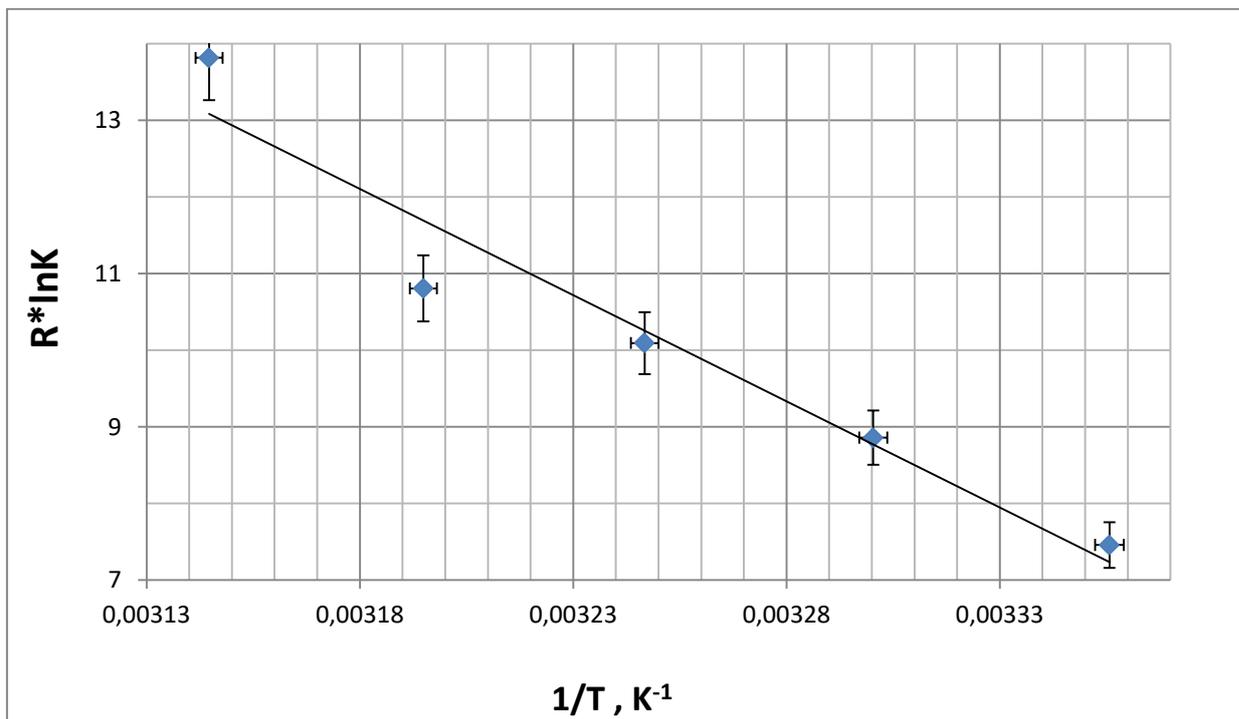


Рисунок 10. Линейная зависимость $R \cdot \ln K$ от обратной температуры, полученная методом наименьших квадратов

В Таблице 3 и рисунках 11[а-г] представлены значения полученных из анализа зависимостей энергий связи ассоциатов в растворах, содержащих и не содержащих БСА при различных значениях рН буфера.

Эозин 50 мкМ	с БСА		без БСА	
	U, кДж	ΔU , кДж	U, кДж	ΔU , кДж
рН 3,5	34,22	1,71	27,70	1,38
4	29,03	1,45	28,42	1,42
5	48,55	2,43	30,73	1,54
6	62,27	3,11	37,35	1,87
7	67,61	3,38	42,39	2,12
8	76,68	3,83	50,28	2,51

Эозин 30 мкМ	с БСА		без БСА	
	U, кДж	ΔU , кДж	U, кДж	ΔU , кДж
рН				
3,5	21,09	1,05	20,77	1,04
4	23,59	1,18	22,239	1,11
5	30,54	1,53	24,61	1,23
6	36,64	1,83	36,3	1,82
7	39,67	1,98	57,874	2,89
8	42,39	2,12	59,41	2,97

Таблица 3. Энергия связи ассоциатов в растворах содержащих БСА и в буферных растворах при различных значениях рН (3,5 – 8)

Для исследования и анализа энергии связи были построены графики зависимости данной величины от рН буферного раствора при различных значениях концентрации наномаркера.

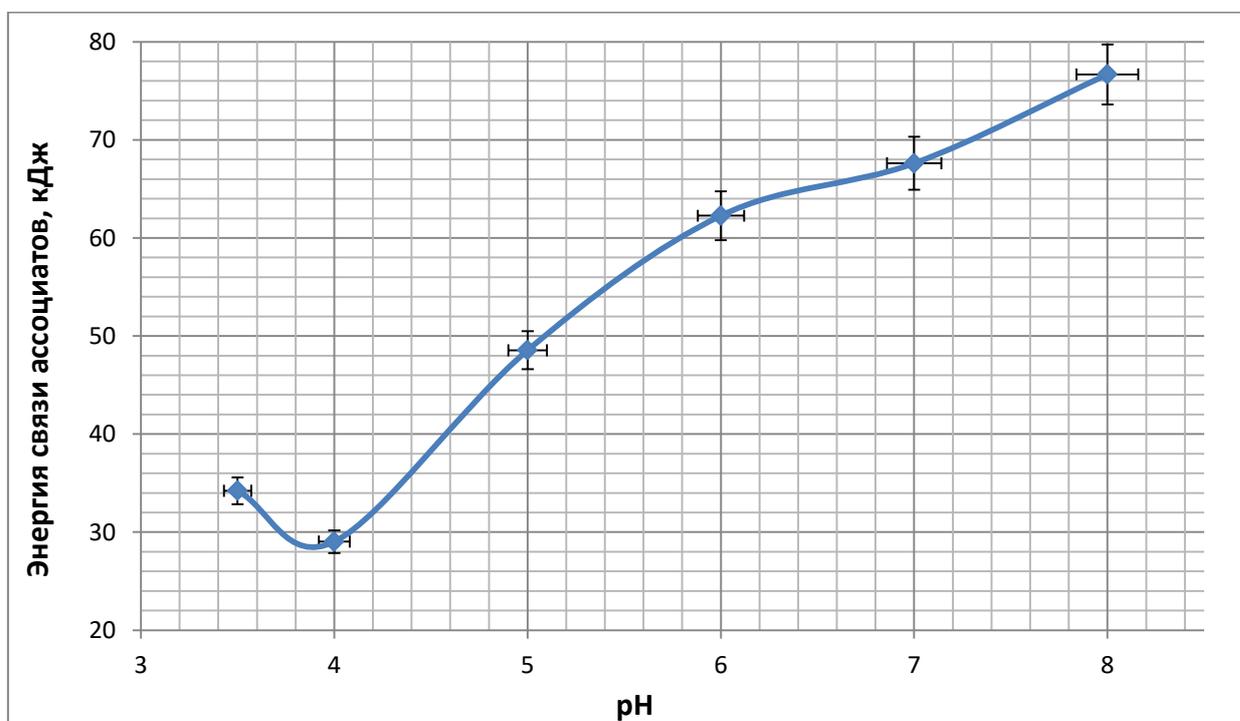


Рисунок 11а. Зависимость энергии связи ассоциатов в растворе 50 мкМ эозина, содержащем БСА от рН буфера

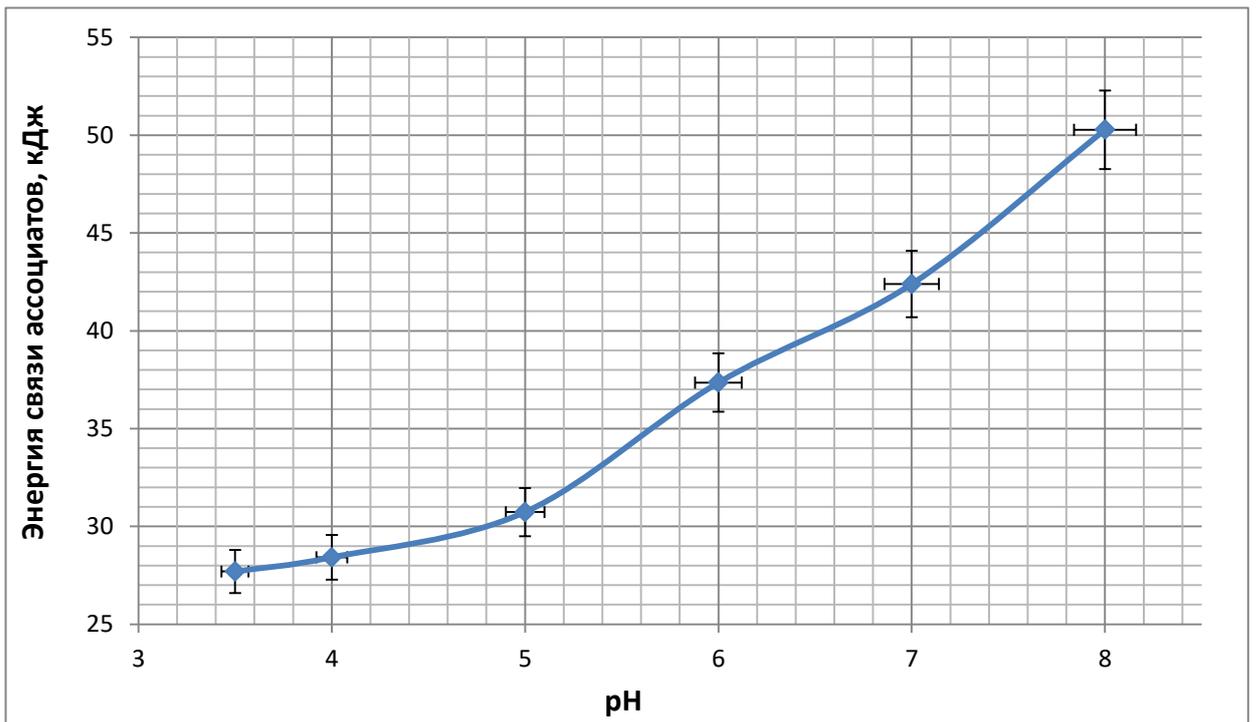


Рисунок 11б. Зависимость энергии связи ассоциатов в растворе 50 мкМ эозина, не содержащем БСА от pH буфера

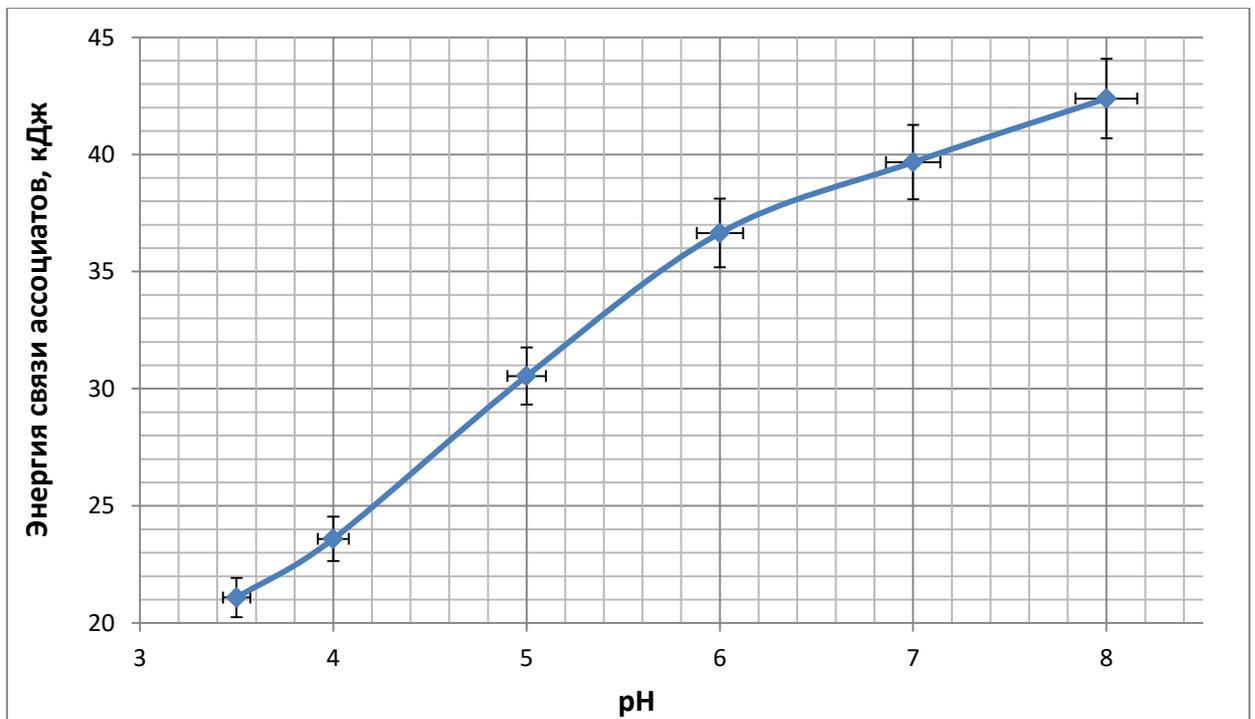


Рисунок 11в. Зависимость энергии связи ассоциатов в растворе 30 мкМ эозина, содержащем БСА от pH буфера

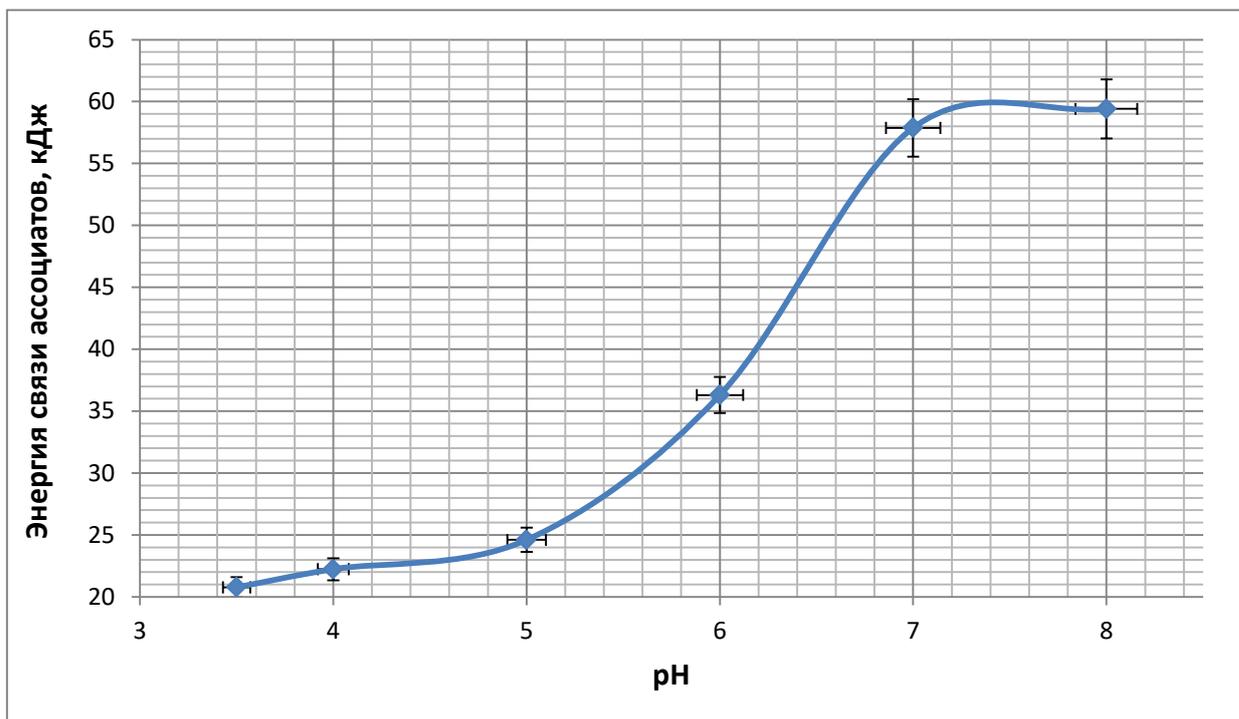


Рисунок 11г. Зависимость энергии связи ассоциатов в растворе 30 мкМ эозина, не содержащем БСА от pH буфера

С увеличением pH буферного раствора увеличивается отрицательный заряд эозина, что и обуславливает возрастание энергии связи образующихся в растворе ассоциатов наномаркеров.

Также энергия связи увеличивается с добавлением в раствор молекул БСА, что является результатом связывания молекул наномаркера с макромолекулами белка.

Основные результаты и выводы работы

- 1) Были получены и проанализированы спектры поглощения растворов наномаркера различных концентраций в растворах с БСА и буферных растворах при вариации рН (от 3,5 до 8,0) и определены степени ассоциации. Для всех полученных спектров поглощения красителя эозина, как в растворах без альбумина, так и в растворах с ним, было обнаружено два максимума поглощения (коротковолнового максимума, характеризующего наличие ассоциатов флуоресцентного маркера в растворе, и длинноволнового максимума, соответствующего мономерам исследуемого зонда). С увеличением значений рН возрастает отрицательный заряд эозина, и его усиливающееся взаимное отталкивание препятствует образованию ассоциатов.
- 2) Было показано, что степень ассоциации молекул эозина, как в растворах без белка, так и в растворах с БСА, возрастает с увеличением концентрации красителя. Из сравнения графиков видно, что степень ассоциации молекул эозина в растворах БСА меньше степени ассоциации молекул эозина в растворах без белка при соответствующих значениях рН и соответствующих концентрациях эозина, что объясняется связыванием эозина с молекулами БСА и, соответственно, уменьшением доли несвязанных с белком молекул эозина, способных к образованию ассоциатов.
- 3) Также были получены и проанализированы спектры поглощения растворов наномаркера эозина различных концентраций в растворах с БСА и буферных растворах при различных рН (от 3,5 до 8,0) в зависимости от температуры образца (от 25 до 45 градусов Цельсия) и определены степени ассоциации.
- 4) Были рассчитаны и проанализированы величины энергий связи ассоциатов в растворах эозина. С увеличением рН буферного раствора увеличивается отрицательный заряд эозина, что и обуславливает возрастание энергии связи образующихся в растворе ассоциатов наномаркеров. Энергия

связи увеличивается с добавлением в раствор молекул БСА, что является результатом связывания молекул наномаркера с макромолекулами белка.

Список цитируемой литературы

1. Левшин Л. В., Салецкий А. М., «Люминесценция и её измерения», М., Издательство Московского университета, 1989.
2. Лакович Д., «Основы флуоресцентной спектроскопии», М., Мир, 1986.
3. Паркер С., «Фотолюминесценция растворов», М., Мир, 1972.
4. Добрецов Г. Е., «Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов», М., Наука, 1989.
5. Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T., Tatikolov A.S., Use of a cyanine dye as a probe for albumin and collagenin the extracellular matrix. // Analytical Biochemistry, 2007, v.361, p.183–189
6. Gerasov A., Shandura M., Kovtun Y., Losytskyy M., Negrutcka V., Dubey I., Fluorescent labeling of proteins with amine-specific 1,3,2-(2H)-dioxaborine polymethine dye // Analytical Biochemistry, 2012, v. 420, p. 115-120.
7. Beckera H.M., Chena M., Hayc J.B., Cybulsky M.I., Tracking of leukocyte recruitment into tissues of mice by in situ labeling of blood cells with the fluorescent dye CFDA SE // Journal of Immunological Methods, 2004, v. 286, p. 69–78.
8. Kurtaliev E.N., Spectroscopic study of interaction of styrylcyanine dye Sbt and its derivatives with bovine serum albumin // Journal of Luminescence, 2012, v. 132, p. 2281–2287.
9. Lianga S., Liua Y., Xiang J., Qinb M., Yub H., Yanb G., Fabrication of a new fluorescent polymeric nanoparticle containing naphthalimide and investigation on its interaction with bovine serum albumin // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, v. 116, p. 206–210.
10. Volkova K.D., Kovalska V.B., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Kryvorotenko D.V., Yarmoluk S.M., Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes // Dyes and Pigments, 2007, v. 72, p. 285-292.

11. Volkova K.D., Kovalska V.B., Losytskyy M.Y., Reis L.V., Santos P.F., Almeida P., Lynch D.E., Yarmoluk S.M., Aza-substituted squaraines for the fluorescent detection of albumins // *Dyes and Pigments*, 2011, v. 90, p. 241-47.
12. Kitamura M., Murakami K., Yamada K., Kawai K., Kunishima M., Binding of sulforhodamine B to human serum albumin: A spectroscopic study // *Dyes and Pigments*, 2013, v. 99, p. 588-593.
13. Chen M., He X., Wangc K., He D., Yang X., Shi H., Inorganic fluorescent nanoprobe for cellular and subcellular imaging // *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, v. 58, p. 120-129
14. Bastiat G., Pritz C.O., Roider C., Fouchet F., Lignières E., Jesacher A., Glueckert R., Ritsch-Marte M., Schrott-Fischer A., Saulnier P., Benoit J., A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: A real challenge for fluorescence imaging // *Journal of Controlled Release*, 2013, v. 170, p. 334–342.
15. Tatikolov A.S., Costa S.M.B., Complexation of polymethine dyes with human serum albumin: a spectroscopic study // *Biophysical Chemistry*, 2004, v. 107, p. 33–49.
16. Dobretsov G., Polyak B., Smolina N., Babushkina T., Syreishchikova T., Klimova T., Sverbil V., Peregudov A., Gryzunov Y., Sarkisov O., Interaction of a fluorescent probe, CAPIDAN, with human serum albumin // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, v. 251, p. 134– 140.
17. Tatikolov A.S., Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2012, v. 13, p. 55-90.
18. Lindberg D.J., Wranne M.S., Gatty M.G., Westerlund F., Esbjorner E.K., Steady-state and time-resolved Thioflavin-T fluorescence can report on morphological differences in amyloid fibrils formed by Ab(1-40) and Ab(1-42) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, v. 458, p. 418-423.

19. Veiksina S., Kopanchuk S., Rincken A., Fluorescence anisotropy assay for pharmacological characterization of ligand binding dynamics to melanocortin 4 receptors // *Analytical Biochemistry*, 2010, v. 402, p. 32-39.
20. Gerasov A., Shandura M., Kovtun Y., Losytskyy M., Negrutskaya V., Dubey I., Fluorescent labeling of proteins with amine-specific 1,3,2-(2H)-dioxaborine polymethine dye // *Analytical Biochemistry*, 2011, v. 420, p. 115-120.
21. Zadeh P.S.N., Mallak K.A., Carlsson N., Åkerman B., A fluorescence spectroscopy assay for real time monitoring of enzyme immobilization into mesoporous silica particles // *Analytical Biochemistry*, 2015, v. 476, p. 51-58.
22. Fernández-Sierra M., Quicones E., Assays for the determination of the activity of DNA nucleases based on the fluorometric properties of the YOYO dye // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, v. 570, p. 40-46.
23. Akimoto S., Teshigahara A., Yokono M., Mimuro M., Nagao R., Tomo T., Excitation relaxation dynamics and energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll a/c-protein complexes, probed by time-resolved fluorescence // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, v. 1837, p. 1514-1521.
24. Alveroglu E., Yavarinia N., Yilmaz Y., Kinetics of ZnO nanoparticle formation via fluorescence measurements // *Journal of Luminescence*, 2013, v. 143, p. 741-745.
25. Wang X., Zhang Z., Ma X., Wen J., Geng Z., Wang Z., Real-time fluorescence assays of alkaline phosphatase and ATP sulfurylase activities based on a novel PPI fluorescent probe // *Talanta*, 2015, v. 137, p. 156-160.
26. Chib R., Raut S., Shah S., Grobelna B., Akopova I., Rich R., Sørensen T.J., Laursen B.W., Grajek H., Gryczynski Z., Gryczynski I., Steady state and time resolved fluorescence studies of azadioxatriangulenium (ADOTA) fluorophore in silica and PVA thin films // *Dyes and Pigments*, 2015, v. 117, p. 16-23.
27. Ding F., Zhang L., Diao J., Xiu-Nan Li, Ma L., Sun Y., Human serum albumin stability and toxicity of anthraquinone dye alizarin complexone: An albumin–dye model // *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, v. 79, p. 238-246.

28. Veettil S., Budisa N., Jung G., Photostability of green and yellow fluorescent proteins with fluorinated chromophores, investigated by fluorescence correlation spectroscopy // *Biophysical Chemistry*, 2008, v. 136, p. 38-43.
29. Fonin A.V., Povarova O.I., Staiano M., D'Auria S., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., The trehalose/maltose-binding protein as the sensitive element of a glucose biosensor // *Optical Materials*, 2014, v. 36, p. 1676-1679.
30. Jaroszewicz L.R., Majchrowski A., Brik M.G., AlZayed N., Kuznik W., Kityk I.V., Kłosowicz S., Specific features of fluorescence kinetics of Pr⁺³ doped BiB₃O₆ glasses // *Journal of Alloys and Compounds*, 2012, v. 538, p. 220-223.
31. Viseua M.I., Tatikolovb A.S., Correiaa R.F., Costa S.M.B., Time evolution of monomers and aggregates of a polymethine dye probe the dynamics of model vesicles and micelles // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, v. 280, p. 54-62.
32. Bodis E., Raics K., Nyitrai M., Majer Z., Lukacs A., Fluorescence lifetime distributions report on protein destabilization in quenching experiments // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, v. 129, p. 108-114.
33. Wang G., Gao Y., Geng M.L., Analysis of heterogeneous fluorescence decays in proteins. Using fluorescence lifetime of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate to probe apomyoglobin unfolding at equilibrium // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, v. 1760, p. 1125-1137.
34. Zhang Q., Deng T., Li J., Xu W., Shen G., Yu R., Cyclodextrin supramolecular inclusion-enhanced vpyrene vexcimer switching for time-resolved fluorescence detection of biothiols in serum // *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, v. 68, p. 253-258.
35. Rhodes A. A., Swartz B.L., Hosler E.R., Snyder D.L., Benitez K.M., Chohan B.S., Basu S., Static quenching of tryptophan fluorescence in proteins by adioxomolybdenum(VI) thiolate complex // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, v. 293, p. 81-87.
36. Mora A.K., Murudkar S., Singh P.K., Nath S., Effect of fibrillation on the excited state dynamics of tryptophan in serum protein – A time-resolved

fluorescence study // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2015, v. 299, p. 73-79.

37. Zakharova G.V., Zhizhimov D.A., Sazonov S.K., Avakyan V.G., Gromov S.P., Görner H., Chibisov A.K., Photoprocesses of alkyl meso-thiacarbocyanine dyes in the presence of cucurbit[7]uril // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2015, v. 302, p. 69-77.

38. S. Bhattacharyya, J.P. Renn, H. Yu, J.F. Marko, A. Matouschek, An assay for 26S proteasome activity based on fluorescence anisotropy measurements of dye-labeled protein substrates, *Analytical Biochemistry* (2016).

39. P. Anees, K. V. Sudheesh, P. Jayamurthy, A. R. Chandrika, R. V. Omkumar and A. Ajayaghosh., A protein-dye hybrid system as narrow range tunable intracellular pH sensor // *Chem. Sci.*, 2016

40. Vladyslava Kovalska, Svitlana Chernii, Mykhaylo Losytskyy, Yan Dovbii, Iryna Tretyakova, Rafal Czerwieniec, Victor Chernii, Sergiy Yarmoluk, Sergiy Volkov. b-ketoenole dyes: Synthesis and study as fluorescent sensors for protein amyloid aggregates // *Dyes and Pigments* 132 (2016) 274-281

41. Laramie P. Jameson, Nicholas W. Smith, Onofrio Annunziata and Sergei V. Dzyuba. Interaction of BODIPY dyes with bovine serum albumin: a case study on the aggregation of a click-BODIPY dye // *PCCP* (2016)

42. Maurizio Baldassarre, Matthew Bennett and Andreas Barth. Simultaneous acquisition of infrared, fluorescence and light scattering spectra of proteins: direct evidence for pre-fibrillar species in amyloid fibril formation // *Analyst* (2016)

43. Yang Yu, Yanyan Huang, Fang Hu, Yulong Jin, Guanxin Zhang, Deqing Zhang and Rui Zhao. Self-Assembled Nanostructures Based on Activatable Red Fluorescent Dye for Site-Specific Protein Probing and Conformational Transition Detection // *Analytical Chemistry* (2016)

44. Ahmed S. Abdelfattah, XSamouil L. Farhi, Yongxin Zhao, Daan Brinks, XPeng Zou, Araya Ruangkittisakul, Jelena Platasa, XVincent A. Pieribone, Klaus Ballanyi, Adam E. Cohen, and Robert E. Campbell. A Bright and Fast Red Fluorescent Protein Voltage Indicator That Reports Neuronal Activity in

Organotypic Brain Slices // The Journal of Neuroscience, February 24, 2016
36(8):2458–2472

45. Sabyasachi Chatterjee, Gopinatha Suresh Kumar. Binding of fluorescent acridine dyes acridine orange and 9-aminoacridine to hemoglobin: Elucidation of their molecular recognition by spectroscopy, calorimetry and molecular modeling techniques // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 159 (2016) 169–178

46. Miao Qin, Tianxiang Yin & Weiguo Shen. The Interaction Between Crystal Violet and Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Investigations // Journal of Dispersion Science and Technology (2016)

47. Carini Aparecida Lelis, Eliara Acipreste Hudson, Guilherme Max Dias Ferreira, Gabriel Max Dias Ferreira, Luis Henrique Mendes da Silva, Maria do Carmo Hespanhol da Silva, Maximiliano Soares Pinto, Ana Clarissa dos Santos Pires. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum Albumin // Food Chemistry 217 (2017) 52–58

48 Ayşe Özdemir, Elmas Gökoğlu, Esra Yılmaz, Ergin Yalçın, Esra Gökoğlu, Zeynel Seferoğlu and Turgay Tekinay. Investigation of binding properties of dicationic styrylimidazo[1,2-a]pyridinium dyes to human serum albumin by spectroscopic techniques // The journal of Biomedical and Chemical Luminescence (2016)

49. Przemysław Krawczyk, Beata Jędrzejewska, Marek Pietrzak, Tomasz Janek. Synthesis, spectroscopic, physicochemical properties and binding site analysis of 4-(1H-phenanthro[9,10-d]-imidazol-2-yl)-benzaldehyde fluorescent probe for imaging in cell biology: Experimental and theoretical study // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 164 (2016) 112–122

50. Abdullah Salci & Mahmut Toprak. Spectroscopic investigations on the binding of Pyronin Y to human serum albumin // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics (2016)

- 51 Jinjie Wang, Heng Liu, Xiangyi Huang, Jicun Ren. Homogeneous immunoassay for the cancer marker alpha-fetoprotein using single wavelength excitation fluorescence cross-correlation spectroscopy and CdSe/ZnS quantum dots and fluorescent dyes as labels // *Microchim Acta* (2016) 183:749–755
52. Anirban Basu, Gopinatha Suresh Kumar. Multispectroscopic and calorimetric studies on the binding of the food colorant tartrazine with human hemoglobin // *Journal of Hazardous Materials* (2016)
53. Tang Lin, Li Shu, Bi Hongna, Gao Xin. Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with three proteins // *Food Chemistry* 196 (2016) 550–559
54. Przemysław Krawczyk, Marek Pietrzak, Tomasz Janek, Beata Jędrzejewska, Piotr Cysewski. Spectroscopic and nonlinear optical properties of new chalcone fluorescent probes for bioimaging applications: a theoretical and experimental study // *J MolModel* (2016) 22:125
55. Dayong Lin, Xuening Fei, Ran Li, Yingchun Gu, Yalin Tang, Jianguo Zhou, Baolian Zhang. A large stokes-shifted fluorescent dye synthesized as a new probe for the determination of protein // *J Fluoresc* (2016)
56. Tian Li a, Zhengjun Cheng, Lijun Cao, Xiaohui Jiang, Lei Fan. Interactions of two food colourants with BSA: Analysis by Debye-Hückel Theory // *Food Chemistry* 211 (2016) 198–205
57. Maryala Saikiran, Daisuke Sato, Shyam S. Pandey, Takeshi Ohta, Shuzi Hayase, Tamaki Kato. Photophysical characterization and BSA interaction of the direct ring carboxy functionalized unsymmetrical NIR cyanine dyes // *Dyes and Pigments* 140 (2017) 6e13
58. Guimei Wang, Wenjian Xu, Yanyan Guo, Nanyan Fu. Near-infrared squaraine dye as a selective protein sensor based on self-assembly // *Sensors and Actuators B* 245 (2017) 932–937
59. Qiaoyu Yang, Zhongju Ye, Meile Zhong, Bo Chen, Jian Chen, Rongjin Zeng, Lin Wei, Hung-wing Li and Lehui Xiao. Self-Assembled Fluorescent Bovine Serum Albumin Nanoprobes for Ratiometric pH Measurement inside Living Cells // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 9629–9634

60. Marcin Górecki, Francesco Zinna, Tarita Biver, Lorenzo Di Bari. Induced circularly polarized luminescence for revealing DNA binding with fluorescent Marcin // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2017)
61. Yu S. Marfin, E. L. Aleksakhina, D. A. Merkushev, E. V. Romyantsev, K. Tomilova. Interaction of BODIPY Dyes with the Blood Plasma Proteins // *J Fluoresc* (2016)
62. Laxmi N. Jattinagoudar, Sharanappa T. Nandibewoor & Shivamurti A. Chimatadar. Binding of fexofenadine hydrochloride to bovine serum albumin: structural considerations by spectroscopic techniques and molecular docking // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2016)
63. Yasaman Chehrehghanianzabi and Silviya Petrova Zustiak. Study of Polyethylene Glycol-Fluorophore Complex Formation by Fluorescence Correlation Spectroscopy // *Macromolecular Research* (2016)
64. Baishakhi Saha, Gopinatha Suresh Kumar. Binding interaction of phenothiazinium dyes with double stranded RNAs: Spectroscopic and calorimetric investigation // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 167 (2017) 99–110