

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОМАРКЕРОВ
СЕМЕЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕИНА С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ
АЛЬБУМИНОМ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Выполнила студентка 405 группы:
Пенкина Полина Васильевна

подпись студента

Научный руководитель:
кандидат физ.-мат. наук, старший преподаватель
Власова Ирина Михайловна

подпись научного руководителя

Допущена к защите «__» «_____» 2017г.

Зав. кафедрой

профессор Салецкий А.М. _____

подпись зав.кафедрой

Москва
2017

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)	5
§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	5
§1.2. Теория вращательной деполяризации флуоресценции. Модель Левшина – Перрена.....	9
§1.3. Тушение флуоресценции. Теория Штерна – Фольмера.....	12
§1.4. Наномаркеры семейства флуоресцеина.....	14
§1.5. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул.....	16
Глава 2. Методическая часть экспериментов	24
§2.1. Приготовление растворов зондов без белка и с добавлением бычьего сывороточного альбумина для анализа вращательной диффузии зондов.....	24
§2.2. Методика экспериментов для исследования поляризованной флуоресценции зондов для анализа их вращательной диффузии в растворах бычьего сывороточного альбумина.....	24
§2.3. Приготовление растворов зондов без белка и с добавлением бычьего сывороточного альбумина для анализа тушения флуоресценции зондов добавлением белка.....	25
§2.4. Методика экспериментов для исследования тушения флуоресценции зондов добавлением бычьего сывороточного альбумина.....	25
Глава 3. Исследование параметров вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина	26
§3.1. Определение параметров вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях рН.....	26
§3.2. Сравнительный анализ вращательной диффузии исходного соединения флуоресцеина и его галоген-производных в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях рН.....	34
Глава 4. Определение констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с молекулами бычьего сывороточного альбумина по тушению флуоресценции наномаркеров	36
§4.1. Тушение Штерна – Фольмера флуоресценции наномаркеров добавлением в растворы бычьего сывороточного альбумина.....	36
§4.2. Определение констант тушения флуоресценции наномаркеров в растворах БСА (констант связывания наномаркеров с БСА).....	45
Основные результаты и выводы работы	51
Список цитируемой литературы	52

Введение

Методы флуоресцентной спектроскопии с применением флуоресцентных зондов (наномаркеров) с каждым годом всё активнее применяются в лабораторных исследованиях и используются в физике, химии, биологии и медицине.

Использование флуоресцентных зондов (наномаркеров) в исследованиях белковых макромолекул даёт 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 высоко чувствительными датчиками изменений, происходящих с белковыми молекулами.

В частности, с помощью метода флуоресцентных зондов (наномаркеров) исследуется строение сывороточных альбуминов – сывороточного альбумина человека (САЧ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА), как нативных молекул, так и претерпевших химическую модификацию вследствие внешних воздействий.

Исследования с применением флуоресцентных зондов в настоящее время очень актуальны в связи с широким применением зондов в моделировании связывания лекарственных препаратов с сывороточными альбуминами.

Для исследования связывающих центров сывороточных альбуминов (человека и быка), их физико-химических и структурных свойств с целью дальнейшего моделирования связывания с альбуминами ряда лекарственных препаратов применяются флуоресцентные зонды семейства флуоресцеина. К классическим флуоресцентным зондам семейства флуоресцеина относятся – исходное соединение флуоресцеин и его галоген-производные: 4-йод-производная флуоресцеина – эритрозин, 4-бром-производная флуоресцеина – эозин, 4-хлор-4-йод-производная флуоресцеина – бенгальский розовый.

Широкое применение классических флуоресцентных наномаркеров в исследовании сывороточных альбуминов обуславливает интерес к изучению собственных характеристик наномаркеров в растворах белков, что и определило цель настоящей работы.

Целью данной бакалаврской работы являлось изучение флуоресцентными методами характеристик наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА – анализ параметров вращательной диффузии этих зондов в растворах БСА и констант связывания этих зондов с БСА.

В рамках поставленной цели были изучены следующие задачи: во-первых, исследована поляризованная флуоресценция наномаркеров – флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового – в растворах БСА, во-вторых, определены параметры вращательной диффузии данных зондов (коэффициент диффузии, время вращательной релаксации) в растворах БСА, в-третьих, исследовано тушение неполяризованной флуоресценции данных наномаркеров добавлением различных концентраций БСА, в-четвертых, по анализу тушения флуоресценции определены константы связывания наномаркеров с БСА при различных значениях pH.

Глава 1. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)

§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Люминесценция – один из широко распространенных в природе видов излучения. Люминесценция возникает в результате поглощения веществом энергии возбуждения и перехода его атомов 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 [1-3]. Если возбуждение происходило за счёт поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения в процессе релаксации носит название фотолюминесценции.

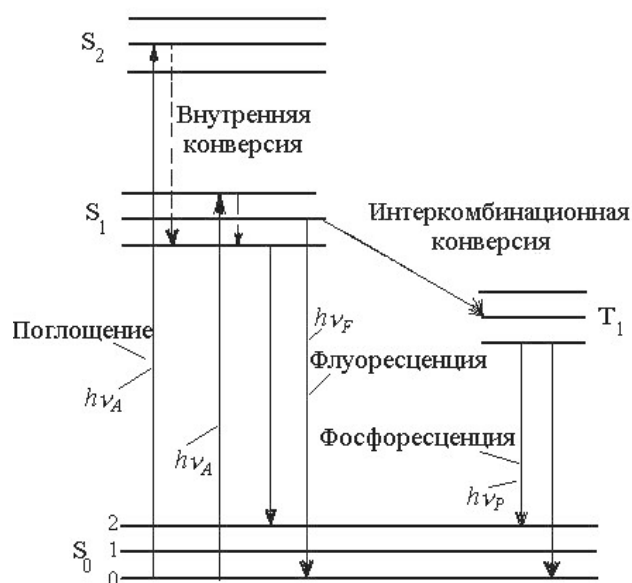


Рис.1.1. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

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.

При переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность, наблюдается флуоресценция (рис. 1.1): обычно между синглетными первым возбужденным и основным состояниями $S_1 \rightarrow S_0$. Среднее время жизни молекулы в возбужденном синглетном состоянии мало, и явление флуоресценции связано с высокой вероятностью перехода молекул в основное синглетное состояние. Флуоресценция представляет собой свечение, мгновенно затухающее после прекращения возбуждения ($\sim 10^{-9}$ с).

Оптические переходы с испусканием излучения между электронными состояниями разной мультиплетности, обычно нижним возбужденным триплетным и основным синглетным $T_1 \rightarrow S_0$, приводят к явлению фосфоресценции (рис. 1.1.). По причине большого естественного времени жизни триплетного состояния и очень малой вероятности данного перехода константа скорости затухания фосфоресценции мала, что и объясняет длительное «послесвечение» фосфоресценции. Фосфоресценция представляет собой свечение, продолжающееся заметный промежуток времени (больше 10^{-6} с) после прекращения возбуждения.

Возможные безызлучательные переходы между различными электронными состояниями одной и той же мультиплетности называются внутренней конверсией. Возможные безызлучательные переходы между различными электронными состояниями разной мультиплетности называются интеркомбинационной конверсией.

Остановимся теперь на рассмотрении люминесцентно – спектральных характеристик сложных молекул:

1. Спектр люминесценции представляет собой функцию распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн или частотам. Каждой полосе поглощения первого электронного возбужденного состояния соответствует полоса флуоресценции.

2. Спектр возбуждения представляет собой относительную эффективность различных длин волн возбуждающего света вызывать

флуоресценцию. Это функция распределения излучаемой веществом энергии в зависимости от длины волны (или частоты) возбуждения.

В принципе форма спектра возбуждения должна быть идентична форме спектра поглощения молекул и не зависеть от длины волны, при которой измеряют флуоресценцию. Однако это выполняется очень редко. Дело в том, что спектры поглощения и возбуждения могут отличаться из-за различия химических и физических свойств молекулы в возбужденном состоянии по сравнению с основным.

Одним из важных свойств люминесценции является различие её длительности у разных излучающих систем. Длительность свечения вещества обычно представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекулы остаются в возбужденном состоянии. Затухание флуоресценции происходит по экспоненциальному закону:

$$I = I_0 e^{-t/\tau},$$

где I – интенсивность флуоресценции спустя время t после прекращения облучения; I_0 – постоянная интенсивность флуоресценции во время облучения; τ – среднее время затухания, за которое интенсивность флуоресценции уменьшается от исходной величины в e раз (величина порядка 10^{-4} - 10^{-9} с), или длительность возбужденного состояния.

Реальное время жизни люминесцирующего возбужденного состояния, как и среднее время затухания τ , зависит не только от вероятности излучательных переходов или величины константы скорости затухания люминесценции $k_{\text{люм}}$, но и от констант скорости всех других процессов: внутренней ($k_{\text{вн.к}}$) и интеркомбинационной ($k_{\text{ин.к}}$) конверсий и фотохимических реакций ($k_{\text{ф.р}}$):

$$\tau = 1 / (k_{\text{люм}} + k_{\text{вн.к}} + k_{\text{ин.к}} + k_{\text{ф.р}}).$$

Взаимное расположение спектров поглощения и люминесценции является важной закономерностью молекулярной люминесценции. Спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со

спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн. Эта зависимость получила название закона Стокса – Ломмеля, который может быть записан в следующем виде: $h\nu_{\text{люм}}^{\text{макс}} < h\nu_{\text{погл}}^{\text{макс}}$.

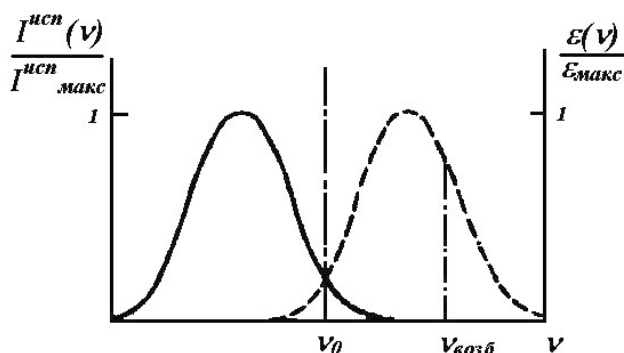


Рис. 1.2. Правило зеркальной симметрии Левшина.

Полосы спектра флуоресценции с низкочастотной стороны 0-0-полосы (перехода между нулевым колебательным уровнем первого возбужденного электронного состояния и нулевым колебательным уровнем основного электронного состояния) расположены зеркально симметрично соответствующим полосам спектра поглощения, расположенным с высокочастотной стороны 0-0-полосы. Явление приближенной зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции (рис. 1.2) названо по имени его первого исследователя правилом Левшина. Правило зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции может быть сформулировано следующим образом: нормированные спектры поглощения и люминесценции зеркально-симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения спектров.

Выход люминесценции отражает эффективность преобразования веществом возбуждающего излучения в свет люминесценции. Разделяют энергетический и квантовый выходы люминесценции.

Энергетический выход Γ равен отношению испускаемой при люминесценции энергии $E_{\text{исп}}$ к поглощенной энергии $E_{\text{погл}}$:

$$\Gamma = E_{\text{исп}} / E_{\text{погл}} .$$

Квантовый выход γ равен отношению числа квантов люминесценции, испускаемых единицей объема вещества в единицу времени $N_{исп}$, к числу поглощенных фотонов возбуждающего излучения $N_{погл}$:

$$\gamma = N_{исп} / N_{погл}.$$

Квантовый выход также можно определить через константы скорости затухания люминесценции и безызлучательных процессов:

$$\gamma = k_{люм} / (k_{люм} + k_{вн.к} + k_{ин.к} + k_{ф.р}) = \tau \cdot k_{люм}.$$

Энергетический и квантовый выходы люминесценции связаны между собой соотношением:

$$\Gamma = \gamma \cdot (V_{люм} / V_{возб}),$$

где $V_{люм}$ – средняя частота полосы люминесценции, $V_{возб}$ – частота возбуждающего излучения.

Так как $V_{люм} < V_{возб}$, то энергетический выход люминесценции меньше квантового $\Gamma < \gamma$. Часть энергии возбуждения всегда расходуется на развитие безызлучательных переходов. Выход люминесценции чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению свечения.

§1.2. Теория вращательной деполяризации флуоресценции. Модель Левшина – Перрена

Довольно большое внимание в люминесцентном анализе уделяется исследованию поляризованной люминесценции. Молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому люминесцентное излучение каждой молекулы частично поляризовано. Если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция – неполяризованной. Таким образом, для возникновения поляризации люминесценции необходима анизотропия ориентационного распределения излучателей.

При возбуждении вещества линейно-поляризованным светом его поглощение осуществляется молекулами, у которых поглощающий

осциллятор параллелен электрическому вектору падающего света; поглощение полностью отсутствует у молекул, поглощающий осциллятор которых перпендикулярен электрическому вектору возбуждающего света. Молекулы, ориентированные промежуточным образом, обладают некоторыми промежуточными значениями вероятности поглощения. Иными словами, при взаимодействии поляризованного света с веществом преимущественно возбуждаются молекулы, обладающие наиболее близкой ориентацией по отношению к направлению колебаний электрического вектора возбуждающего света. Естественно, что в таких условиях электрический вектор света люминесценции также должен обладать преимущественным направлением. Интенсивность люминесценции в произвольном направлении можно представить в виде суммы двух световых потоков $I_{||}$ и I_{\perp} , поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям, где $I_{||}$ и I_{\perp} - интенсивности люминесценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света. Поэтому для количественной оценки поляризованной люминесценции вводится понятие степень поляризации люминесценции:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}},$$

где $I_{||}$ и I_{\perp} - интенсивности свечений, поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям.

В работах многих авторов используется и иная характеристика поляризованной люминесценции – степень анизотропии излучения:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}.$$

Между степенью поляризации люминесценции P и степенью анизотропии излучения r существует простая связь:

$$r = \frac{2P}{3 - P}.$$

Поляризованная люминесценция обычно наблюдается при возбуждении линейно-поляризованным светом.

Метод поляризованной флуоресценции позволяет оценивать параметры вращательной диффузии флуорофоров [4-5]. Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В. Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии. На основе этой теории было получено выражение для степени поляризации P флуоресценции:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{kT\tau_0}{V\eta},$$

где T – абсолютная температура, η – вязкость раствора, V – объем, k – постоянная Больцмана, τ_0 – среднее время жизни возбужденных молекул, P_0 – предельная степень поляризации флуоресценции.

Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. Таким образом меняя либо вязкость растворов, либо их температуру, и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс

$$\operatorname{tg}\varphi = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{k\tau_0}{V}$$

при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема

$$V = \frac{(3 - P_0) \cdot k \cdot \tau_0}{3 \cdot P_0 \cdot \operatorname{tg}\varphi}$$

и, следовательно, эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна a , связанный с молекулярным объемом соотношением

$$V = \frac{4\pi a^3}{3}.$$

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации (или разупорядочивания вследствие тепловой диффузии) ξ флуорофора по формуле:

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk}, \text{ где } V - \text{молекулярный объем.}$$

Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии $D_{\text{вращ}}$:

$$D_{\text{вращ}} = \frac{kT}{6\eta V}.$$

В данной работе путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА.

§1.3. Тушение флуоресценции. Теория Штерна – Фольмера

Выход люминесценции чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению свечения. Тушение люминесценции может вызываться различными способами: посторонними примесями, температурным воздействием, высокими концентрациями. Механизм тушения обычно связан с развитием безызлучательных процессов потери энергии возбуждения, во-первых, за счёт увеличения числа столкновений частиц, во-вторых, за счёт образования нелюминесцирующих комплексов и т.д. В люминесцентном анализе учёт тушения, влияющего на интенсивность люминесценции, играет важную роль.

Связывание наномаркеров (зондов) в качестве низкомолекулярных лигандов с макромолекулами белка описывается в терминах физической химии и определяется по тушению флуоресценции зондов добавлением различных концентраций тушителя – белка [4-5].

В качестве характеристик связывания флуоресцентных наномаркеров (зондов) с макромолекулами белка рассматриваются два параметра –

константа связывания зонда с белком (K) и число центров связывания на белке для данного зонда (N). Оба параметра определяются из спектров флуоресценции по теории Скэтчарда.

Как известно, наномаркеры семейства флуоресцеина связываются со связывающим центром I БСА, поэтому в данном случае число центров связывания на этом 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 зонда F можно записать константу связывания наномаркера с белком следующим образом:

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

$[Q-F]$ – концентрация связавшегося с белком зонда F ,

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

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

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

Теория Скэтчарда в применении к спектрам флуоресценции зондов, тушащихся при связывании с белком, описывается уравнением Штерна – Фольмера (при числе центров связывания на белке $N = 1$).

Если связанная с белком форма зонда не флуоресцирует, то доля оставшейся флуоресценции (F/F_0) определяется той частью от общего количества зонда, которая свободна и не связана с белком (f), т.е. $f = [F]/[F_0]$. Учитывая общую концентрацию зонда в растворе $[F_0]$ можно записать константу связывания зонда 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 (зонда) в растворах добавлением различных концентраций тушителя – белка можно записать:

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

F_0 – интенсивность флуоресценции наномаркера (зонда) в отсутствие тушителя (белка), F – интенсивность флуоресценции наномаркера (зонда) в присутствии тушителя (белка), $[Q]$ – концентрация тушителя (белка), K – эффективная константа связывания наномаркера (зонда) с белком (M^{-1}).

График зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ представляет собой прямую линию с наклоном K в случае одного механизма связывания зонда с белком, а при наличии нескольких механизмов связывания зонда с белком наблюдаются некоторые отклонения от линейности.

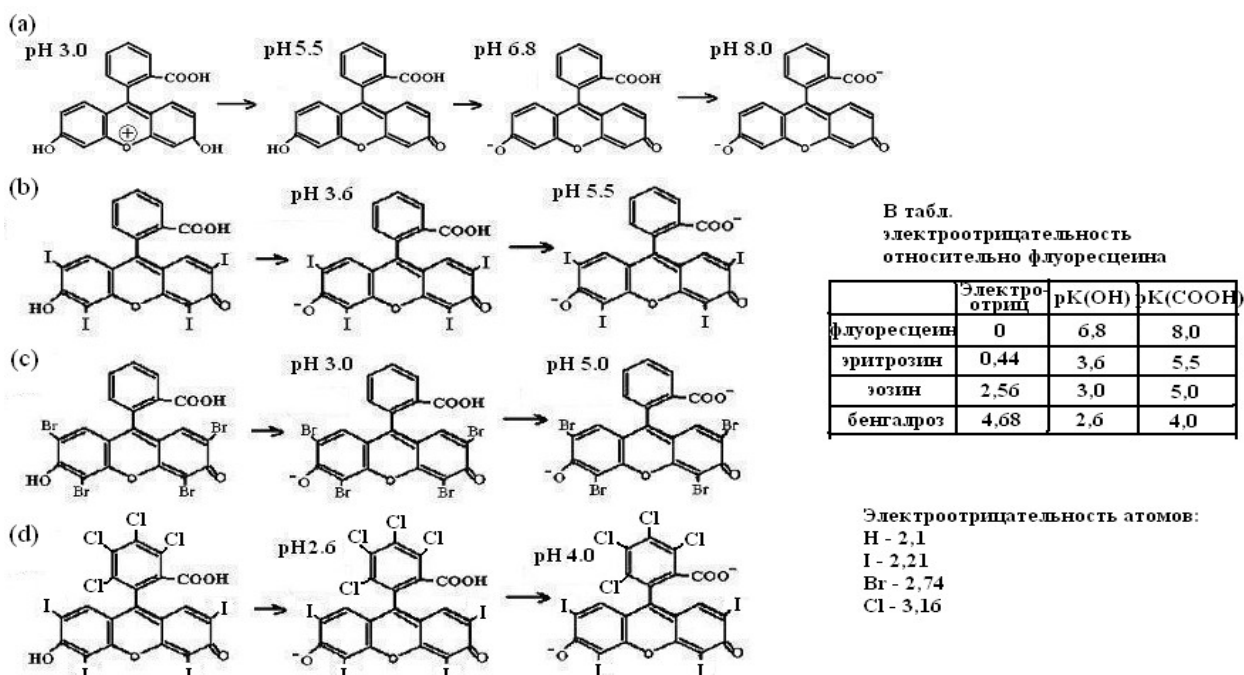
В данной работе рассматривается тушение флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина, обусловленное их связыванием с молекулами БСА.

§1.4. Наномаркеры семейства флуоресцеина

Флуоресцирующие красители (зонды, наномаркеры) широко используются в биологии и медицине, также в биофизике и химии. Флуоресцентным наномаркером (зондом) можно назвать любое флуоресцирующее вещество, если при добавлении к мембранам, белкам, липопротеинам, клеткам его молекулы связываются с ними, а из параметров флуоресценции можно извлечь определенную информацию о структуре или функции биологических объектов.

Механизм связывания лигандов с молекулами сывороточных альбуминов (человека и быка) определяется наличием на белках специфических участков – связывающих центров.

Для исследования связывающих центров сывороточного альбумина человека и бычьего сывороточного альбумина используются анионные при физиологическом рН 7,4 зонды (наномаркеры) семейства флуоресцеина, такие как флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый, структурные формулы которых представлены ниже.



Структурные формулы наномаркеров семейства флуоресцеина и значения pK ионизированных групп: флуоресцеин (а); эритрозин (б); эозин (с); бенгалский розовый (д).

Рис.1.3. Зонды семейства флуоресцеина.

Отличия флуоресцентно – спектральных характеристик этих четырех зондов (наномаркеров) определяются величиной электроотрицательности атомов боковых радикалов зондов: водорода (у флуоресцеина), йода (у эритрозина), брома (у эозина), хлора и йода (у бенгальского розового). Электроотрицательность атомов боковых радикалов зондов оказывает влияние на pK их ионизируемых групп (COOH и OH). Наличие более электроотрицательного атома приводит к сильному уменьшению значений pK(COOH) и pK(OH) этих зондов.

Для флуоресцеина pK(OH) = 6,8; pK(COOH) = 8,0. При pH < 5,5 флуоресцеин находится в слабо положительно заряженной форме. При pH 5,5 – 6,8 флуоресцеин электрически нейтрален. В области pH 6,8 – 8,0 флуоресцеин находится в форме моноаниона. При pH > 8,0 флуоресцеин сильно отрицательно заряжен и находится в форме дианиона.

Для эритрозина pK(OH) = 3,6; pK(COOH) = 5,5. В области pH < 3,6 эритрозин электрически нейтрален. В области pH 3,6 – 5,5 эритрозин слабо отрицательно заряжен (моноанион). При pH > 5,5 эритрозин сильно отрицательно заряжен (дианион).

Для эозина $pK(OH) = 3,0$; $pK(COOH) = 5,0$. При $pH < 3,0$ эозин электрически нейтрален. При $3,0 < pH < 5,0$ эозин слабо отрицательно заряжен (моноанион). При $pH > 5,0$ эозин заряжен сильно отрицательно (дианион).

Для бенгальского розового $pK(OH) = 2,6$, $pK(COOH) = 4,0$. В области $pH < 2,6$ бенгальский розовый электрически нейтрален. При $2,6 < pH < 4,0$ бенгальский розовый слабо отрицательно заряжен (моноанион). При $pH > 4,0$ бенгальский розовый сильно отрицательно заряжен и находится в форме дианиона.

§1.5. Применение флуоресцентных наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул

Спектры люминесценции, как и абсорбционные электронные спектры, применяются для качественного и количественного анализа, в структурных исследованиях, для изучения физико – химических свойств биологических объектов.

Структурное конформационное состояние белков и физико-химические свойства молекул белков широко исследуются в настоящее время с помощью электронной абсорбционной спектроскопии как по собственному поглощению белков в ультрафиолетовой области, так и с помощью молекулярных зондов и меток.

Ни одна из двадцати аминокислот, входящих в состав белков, не поглощает в видимой области спектра и лишь три аминокислоты из них, а именно тирозин, триптофан и фенилаланин, обладают заметным поглощением в ультрафиолетовой области (рис. 1.4). Именно эти три аминокислоты и дают собственное поглощение белков, исследование которого методами абсорбционной спектроскопии позволяет судить о конформационном состоянии и свойствах макромолекул белков [3-5].

Поскольку большинство белков содержит аминокислотные остатки триптофана, измерение поглощения при 280 нм представляет собой

исключительно быстрый и удобный способ определения содержания белка в растворе. Все аминокислоты белков (все двадцать аминокислот) поглощают в дальней ультрафиолетовой области (< 220 нм).

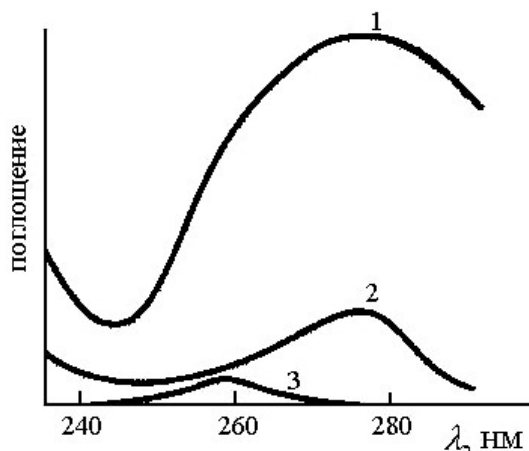


Рис. 1.4 Спектры поглощения триптофана (1), тирозина (2) и фенилаланина (3) в ультрафиолетовой области.

Исследования флуоресценции белков сейчас широко распространены в биологии и медицине. Собственная флуоресценция белковых макромолекул определяется наличием в них ароматических аминокислот – фенилаланина, триптофана и тирозина.

Максимумы спектров флуоресценции фенилаланина, тирозина и триптофана (при возбуждении флуоресценции аминокислот в соответствующих максимумах поглощения) лежат при 282, 303 и 348 нм соответственно. Сопоставление спектров флуоресценции со спектрами поглощения ароматических аминокислот показывает, что максимумы спектров флуоресценции фенилаланина (282 нм), тирозина (303 нм) и триптофана (348 нм) лежат в несколько более длинноволновой области по сравнению с соответствующими максимумами спектров поглощения (258, 275 и 280 нм).

Положение максимума флуоресценции триптофана может изменяться от 348 нм до 359 нм при изменении рН среды.

Спектры флуоресценции белков, содержащих триптофан, обладают только одним, характерным для триптофана максимумом спектра флуоресценции. Максимум спектра флуоресценции триптофана в белках

сдвинут в более коротковолновую область по сравнению с флуоресценцией свободного триптофана в водном растворе [3-5].

На положение максимума спектра флуоресценции белков оказывает также влияние их конформационное состояние. Положение максимума спектра флуоресценции различно у разных белков и изменяется при изменении рН и денатурации белка.

Как указывалось ранее, структура и свойства белков изучаются не только по собственным спектрам поглощения и флуоресценции белков, но и по спектрам поглощения и флуоресценции наномаркеров, зондов и меток, связывающимся с белковыми молекулами и чутко реагирующих на изменение своего окружения.

В частности, большое распространение в настоящее время получили исследования методами электронной абсорбционной спектроскопии и люминесцентной спектроскопии с применением зондов структуры и конформационных состояний основного белка плазмы крови человека – сывороточного альбумина человека.

Большую роль в изучении конформационных перестроек молекул белка при связывании лигандов, а также в исследовании физических свойств связывающих центров белка играют молекулярные флуоресцентные зонды (наномаркеры).

Для изучения структуры и конформационного состояния белков, в частности сывороточного альбумина человека [6], исследуются как флуоресцентные спектры зондов, так и спектры их поглощения.

Например, по спектрам поглощения и флуоресценции молекулярных зондов в [7] исследуются конформационные перестройки сывороточного альбумина человека при денатурации под действием гуанидингидрохлорида. Используемые в работе молекулярные зонды – акрилодан ($\epsilon_{360} = 12,9 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) и продан ($\epsilon_{365} = 14,5 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) – связываются с определенными связывающими центрами на молекуле белка. Центр

связывания акрилодана расположен в домене I, а центр связывания пролина – в домене II.

В [8] методами электронной абсорбционной спектроскопии и люминесцентной спектроскопии определены стехиометрические коэффициенты реакций связывания гесперетина и сывороточного альбумина человека, а также рассчитана константа связывания данного лекарственного препарата с белком.

Результаты исследований механизмов связывания различных соединений флавоноидной природы с сывороточным альбумином человека методами абсорбционной спектроскопии и флуоресцентной спектроскопии представлены в работе [9].

В настоящее время флуоресцентные красители широко применяются в биологических и медицинских исследованиях. Метод флуоресцентных зондов появился около полувека назад на стыке двух направлений: исследования клеток и белков с помощью красителей, с одной стороны, и развития теории и техники электронной абсорбционной и люминесцентной спектроскопии. В 1952 году Лоуренс обнаружил, что белки способны влиять на спектры поглощения и флуоресценции ряда красителей [10]. В работах Лоуренса краситель уже рассматривался как физический датчик (зонд), поглощение и флуоресценция которого отражают свойства окружения хромофора. Именно Лоуренсом были заложены основы метода флуоресцентных зондов как физического метода изучения молекулярной организации биологических объектов.

Ставшие уже классическими флуоресцентные красители (флуоресцеин, эозин, эритрозин, розовый бенгальский, родамин, нильский синий) сейчас широко применяются в исследованиях молекулярной организации белковых макромолекул [11-24].

В [11] представлены исследования возможностей использования цианиновых красителей в качестве флуоресцентных зондов в исследованиях белковых макромолекул.

Использование флуоресцентных зондов и меток 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 и метки тонко чувствуют изменения своего окружения и являются высоко чувствительными датчиками изменений, происходящих с белковыми молекулами.

Работа [12] посвящена обзору флуоресцентных зондов и меток, применяемых в исследованиях белковых макромолекул. В [12] также дано описание некоторых флуоресцентных зондов, применяющихся в белковых исследованиях, и имеющих флуоресценцию в области 600 – 1000 нм, т.е. практически в ближней инфракрасной области – это карбоцианиновые, скварейновые и оксазиновые зонды (рис. 1.5).

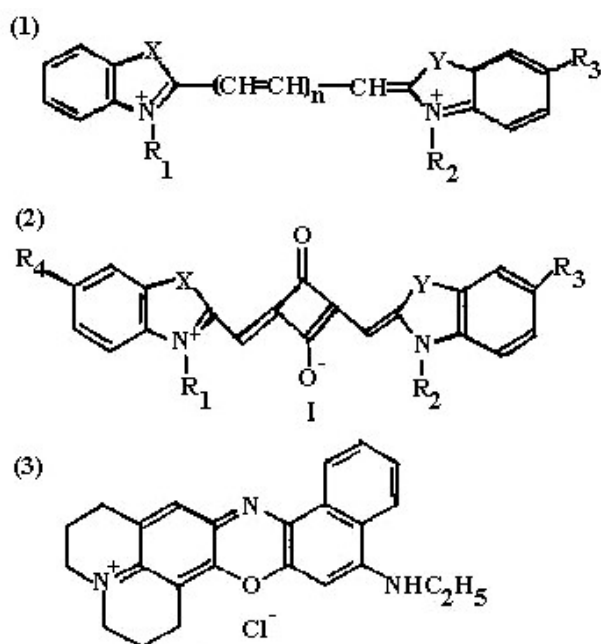


Рис. 1.5 Структура некоторых флуоресцентных красителей, используемых в исследованиях белков
 (1) - карбоцианиновые красители;
 (2) - скварейновые красители;
 (3) - оксазиновые красители.

Работа [13] посвящена изучению связывания скварейновых красителей с молекулами бычьего сывороточного альбумина. Исследование проводилось на скварейновом флуоресцентном зонде NN127 (рис. 1.6).

Работа [14] посвящена изучению флуоресцентного зонда 2-(6-диэтиламинобензо[b]фуран-2-ил)-3-гидроксихромона (FA – зонда), обладающего высокой специфичностью к молекулам бычьего сывороточного альбумина. В [14] показана возможность использования этого зонда в исследованиях связывающих центров бычьего сывороточного альбумина.

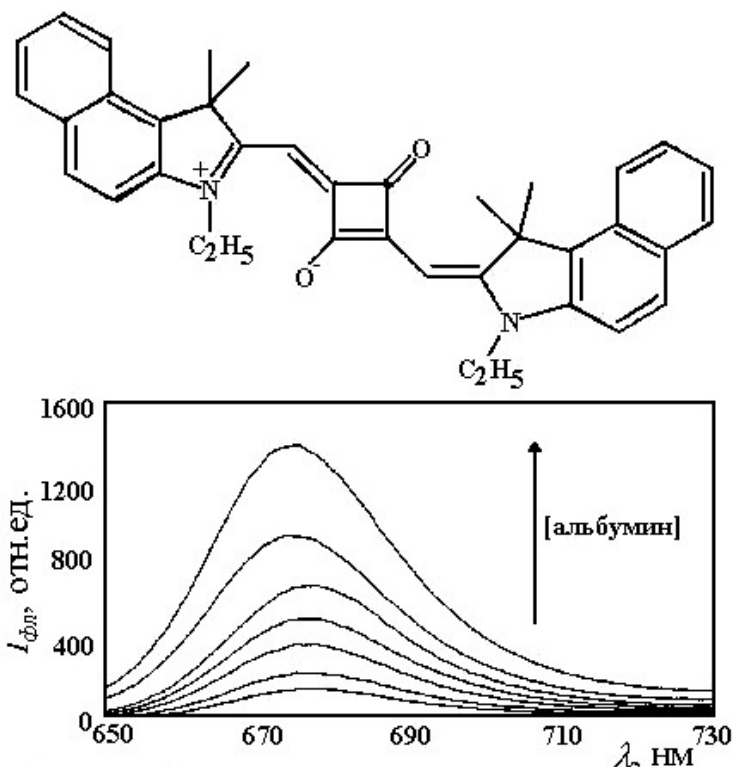


Рис. 1.6. Увеличение интенсивности спектров флуоресценции NN127 (возбуждение 630 нм) при увеличении концентрации бычьего сывороточного альбумина (0,17 - 1,50 мкМ). [NN127] = 1,5 мкМ.

Работа [15] посвящена исследованию конформации молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах по оценке спектров флуоресценции и фосфоресценции эритрозина, добавленного в белковые растворы.

Для обнаружения структурных перестроек белковых макромолекул широко применяется флуоресцентный зонд эозин [16]. Эозин обладает способностью эффективно связываться с белками, что позволяет использовать его в качестве флуоресцентного зонда при анализе структурно – динамического состояния белковых молекул.

Во флуоресцентных исследованиях конформационных перестроек белковых макромолекул применяются самые разнообразные красители [17-19], например, пирроновый красный и нильский синий.

В [17] представлены результаты определения параметров связывания флуоресцентного зонда пирронового красного с молекулами сывороточного альбумина человека.

Работа [18] посвящена исследованию определения микрограммовых количеств бычьего сывороточного альбумина по изменениям спектров флуоресценции нильского синего, добавляемого в растворы белка.

В [20] представлены исследования синтетического зонда 2,3 – бис {[2 – гидроксид – 4 – диэтиламино)(фенил)(метилден)]амино} – 2 – бутендинитрила в растворах различных белков. Изучение увеличения интенсивности флуоресценции (рис. 1.7) данного зонда при связывании его с молекулами белков показывает возможность использования данного зонда для определения белка в растворе (даже при нанограммовом содержании белка в растворе).

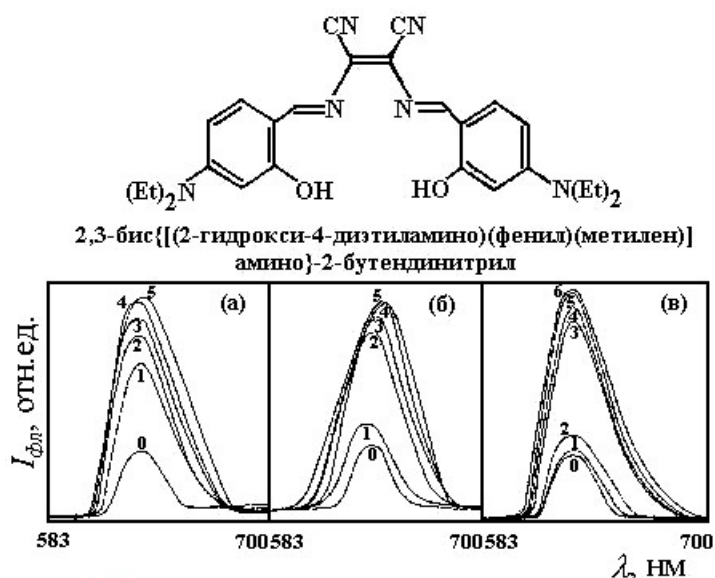


Рис. 1.7. Спектры флуоресценции 2,3-бис {[2-гидроксид-4-диэтиламино)(фенил)(метилден)]амино}-2-бутендинитрила в растворах белков: (а) бычий сывороточный альбумин, (б) - лизоцим, (в) - гемоглобин. Концентрация зонда - 2,5 мкМ. Количество добавленного белка: (0) - 0 нг; (1) - 66 нг; (2) - 160 нг; (3) - 330 нг; (4) - 530 нг; (5) - 660 нг; (6) - 1000 нг. Возбуждение флуоресценции на 563 нм.

В работе [21] методами флуоресцентной спектроскопии исследуется механизм связывания рибонуклеазы А, меченой флуоресцеином, с белком ингибитором рибонуклеазы (R1). Рибонуклеаза А представляет собой фермент, гидролизующий межнуклеотидные связи в молекуле РНК. Рибонуклеаза класса А специфически гидролизует фосфодиэфирную связь между 3'-гидроксильным концом и фосфорной кислотой. Изучение взаимодействия рибонуклеазы А с белком ингибитором рибонуклеазы имеет практический аспект для фармацевтических разработок препаратов, имеющих противоопухолевую активность. Образование комплексов «рибонуклеаза – белок ингибитор рибонуклеазы» и их диссоциация оценивается по изменению флуоресценции флуоресцеина, ковалентно «пришитого» к рибонуклеазе. При образовании комплексов «рибонуклеаза, меченая флуоресцеином – белок ингибитор рибонуклеазы» интенсивность флуоресценции флуоресцеина уменьшается, и, наоборот, при диссоциации этих комплексов – интенсивность свечения флуоресцеина возрастает.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов зондов без белка и с добавлением бычьего сывороточного альбумина для анализа вращательной диффузии зондов

Были приготовлены следующие буферные растворы: 1) 0,1 М $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{KOH}$ (pH 3,5-5,0); 2) 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1$ М NaOH (pH 6,0-8,0).

На их основе были приготовлены растворы (pH 3,5 – 8,0) соответствующего 30 мкМ маркера (флуоресцеина, эритрозина, эозина, бенгальского розового) как без белка, так и содержащие 150 мкМ БСА (Sigma), в которые для анализа вращательной диффузии маркеров в растворах для вариации вязкости были добавлены различные концентрации сахарозы (0 – 200 мМ).

§2.2. Методика экспериментов для исследования поляризованной флуоресценции зондов для анализа их вращательной диффузии в растворах бычьего сывороточного альбумина

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55, спектрально-флуоресцентные характеристики образцов исследовались при комнатной температуре. Измерения флуоресценции образцов проводились через фиксированный интервал времени после добавления всех компонентов.

Флуоресценция маркеров в исследуемых растворах возбуждалась светом со следующими длинами волн: 1) флуоресцеин – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 440$ нм; 2) эритрозин – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{эрит}} = 530$ нм; 3) эозин – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{эоз}} = 520$ нм; 4) бенгальский розовый – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{роз}} = 540$ нм.

Степень поляризации P флуоресценции маркеров в растворах рассчитывалась по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектров испускания флуоресценции маркеров, где $I_{||}$ и I_{\perp} – интенсивности свечений, поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям.

Спектры флуоресценции маркеров обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

§2.3. Приготовление растворов зондов без белка и с добавлением бычьего сывороточного альбумина для анализа тушения флуоресценции зондов добавлением белка

Были подготовлены следующие буферные растворы: 0,1 М CH_3COOH – KOH (pH 3,5 – 5,0) и 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (pH 6,0 – 8,0).

На их основе были приготовлены растворы (3 мкМ) соответствующего наномаркера (флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового) с добавлением различных концентраций БСА (10 – 150 мкМ) при различных значениях pH (3,5 – 8,0).

§2.4. Методика экспериментов для исследования тушения флуоресценции зондов добавлением бычьего сывороточного альбумина

Исследования флуоресценции наномаркеров в растворах БСА проводились на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin Elmer) при комнатной температуре. Измерения флуоресценции растворов наномаркеров проводились через фиксированный интервал времени после добавления в них различных концентраций БСА.

Флуоресценция наномаркеров в исследуемых растворах возбуждалась светом со следующими длинами волн: 1) флуоресцеин – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 440$ нм; 2) эритрозин – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{эрит}} = 530$ нм; 3) эозин – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{эоз}} = 520$ нм; 4) бенгальский розовый – $\lambda_{\text{возб}}^{\text{фл}} = 540$ нм. Спектры флуоресценции наномаркеров обрабатывались программой FL Winlab (Perkin Elmer).

Глава 3. Исследование параметров вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина

§3.1. Определение параметров вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях рН

Для анализа связывания маркеров семейства флуоресцеина с БСА получены спектры поляризованной флуоресценции маркеров в растворах с БСА при различных значениях рН.

Для оценки влияния БСА на поляризацию флуоресценции наномаркеров (флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового) проведен сравнительный анализ степени поляризации флуоресценции (P) маркеров при различных значениях рН, как в растворах без белка, так и в растворах с БСА (рис. 3.1). Степень поляризации флуоресценции маркеров в растворах рассчитывалась по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектров испускания их флуоресценции.

Видно, что степень поляризации P флуоресценции всех четырех маркеров семейства флуоресцеина в растворах с БСА больше, чем в растворах без белка, что объясняется их связыванием с белком.

При этом наблюдаются различия между флуоресцеином и его галоген-производными в зависимостях степени поляризации флуоресценции P от рН.

Как в растворах без белка, так и в растворах БСА, степень поляризации P флуоресценции флуоресцеина нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 6,0. При наличии слабо электроотрицательных атомов водорода в структурной формуле флуоресцеина основное влияние на вращательную диффузию маркера оказывают процессы ионизации флуоресцеина, определяемые значениями его рК, и процессы его молекулярной ассоциации, что приводит, в свою очередь, к нелинейному виду зависимости поляризации флуоресценции маркера от рН.

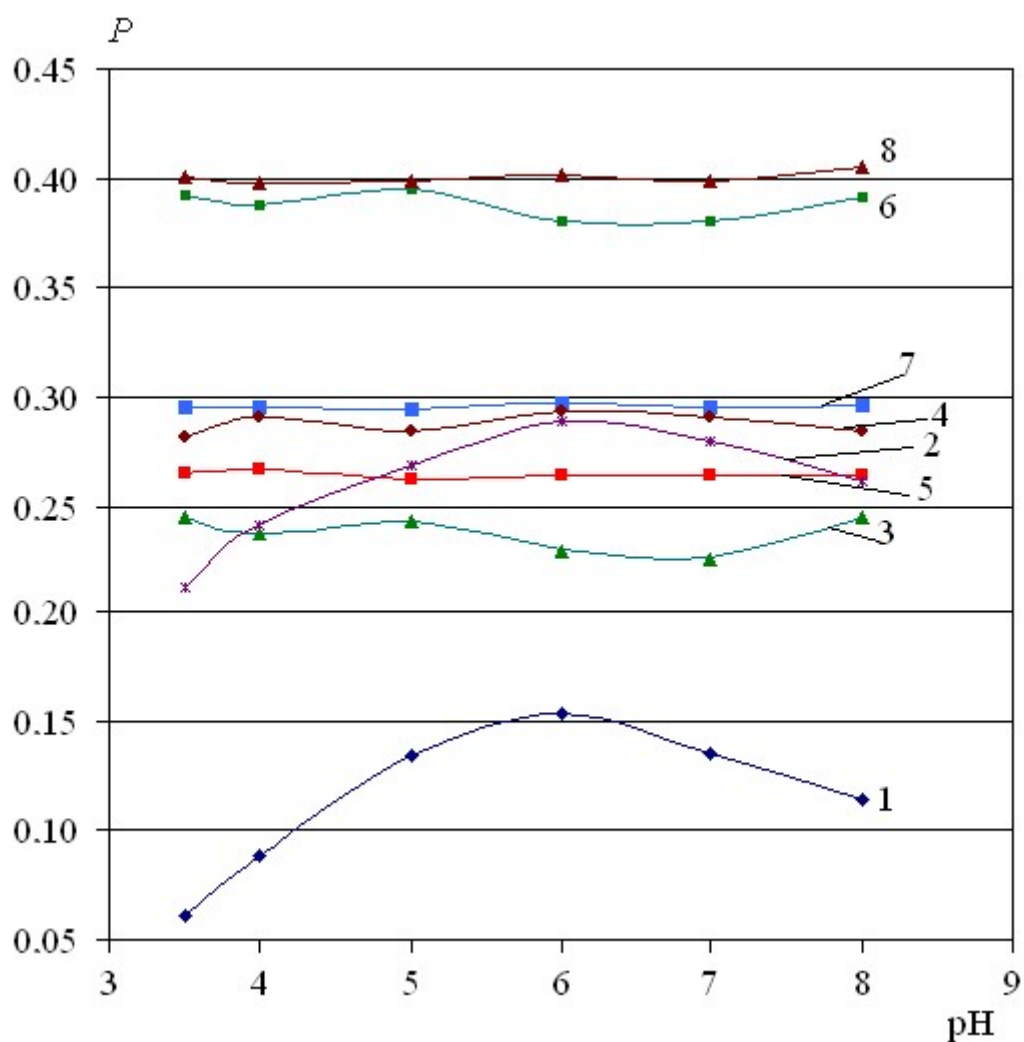


Рис. 3.1. Зависимость от рН степени поляризации флуоресценции наномаркеров: флуоресцеина (1, 2), эритрозина (3, 4), эозина (5, 6) и бенгальского розового (7, 8) в растворах без белка (1, 3, 5, 7) и в растворах 150 мкМ БСА (2, 4, 6, 8).

Тогда как степень поляризации P флуоресценции галоген-производных флуоресцеина (эритрозина, эозина и бенгальского розового) не зависит от рН (в диапазоне $3,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$), как в растворах БСА, так и в растворах без белка, что объясняется наличием в молекулах этих маркеров сильно электроотрицательных атомов (брома, йода, хлора), затрудняющих изменения вращательной диффузии маркеров при вариации значений рН.

Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА наблюдается зависимость величины степени поляризации флуоресценции маркеров от электроотрицательности атомов в их структурных формулах. По мере увеличения электроотрицательности атомов в формулах маркеров значение степени поляризации их флуоресценции возрастает и в растворах без белка, и в растворах с БСА. Степень поляризации флуоресценции маркеров возрастает в ряду флуоресцеин – эритрозин – эозин – бенгальский розовый.

Метод поляризованной флуоресценции позволяет оценивать параметры вращательной диффузии флуорофоров. Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В. Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии. На основе этой теории было получено выражение для степени поляризации P флуоресценции:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{kT\tau_0}{V\eta},$$

где T – абсолютная температура, η – вязкость раствора, V – объем, k – постоянная Больцмана, τ_0 – среднее время жизни возбужденных молекул, P_0 – предельная степень поляризации флуоресценции.

Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. Таким образом меняя либо вязкость растворов, либо их температуру, и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс

$$\operatorname{tg} \varphi = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \frac{k \tau_0}{V}$$

при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного

$$\text{объема } V = \frac{(3 - P_0) \cdot k \cdot \tau_0}{3 \cdot P_0 \cdot \operatorname{tg} \varphi}$$

и, следовательно, эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна a , связанный с молекулярным объемом соотношением

$$V = \frac{4\pi a^3}{3}.$$

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации ξ флуорофора по формуле:

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk}, \text{ где } V \text{ – молекулярный объем.}$$

Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии $D_{\text{вращ}}$:

$$D_{\text{вращ}} = \frac{kT}{6\eta V}.$$

В данной работе путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА при различных значениях рН.

При всех значениях рН в растворах с БСА коэффициент вращательной диффузии $D_{\text{вращ}}$ всех четырех наномаркеров семейства флуоресцеина меньше, чем в растворах без белка (рис. 3.2), что объясняется связыванием наномаркеров с белком.

Как в растворах БСА, так и в растворах без белка, коэффициент вращательной диффузии (рис. 3.2) исходного соединения – флуоресцеина нелинейно зависит от рН с минимумом при рН 6,0, а у галоген-производных флуоресцеина (эритрозина, эозина и бенгальского розового) коэффициент вращательной диффузии практически не зависит от рН (при $3,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$).

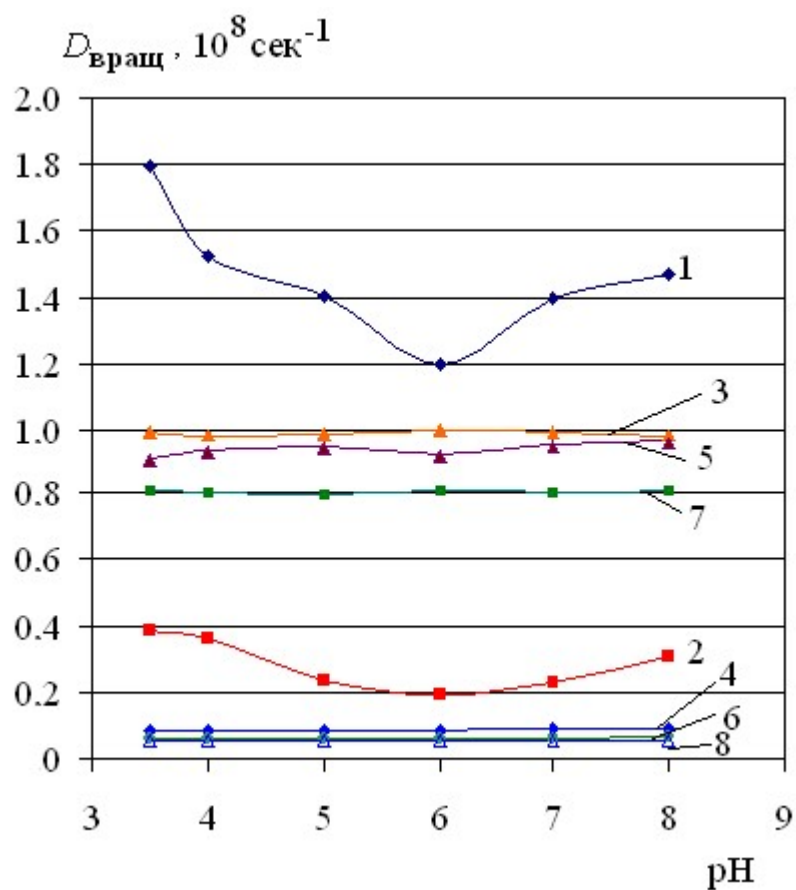


Рис. 3.2. Зависимость от рН коэффициента вращательной диффузии наномаркеров: флуоресцеина (1, 2), эритрозина (3, 4), эозина (5, 6) и бенгальского розового (7, 8) в растворах без белка (1, 3, 5, 7) и в растворах 150 мкМ БСА (2, 4, 6, 8).

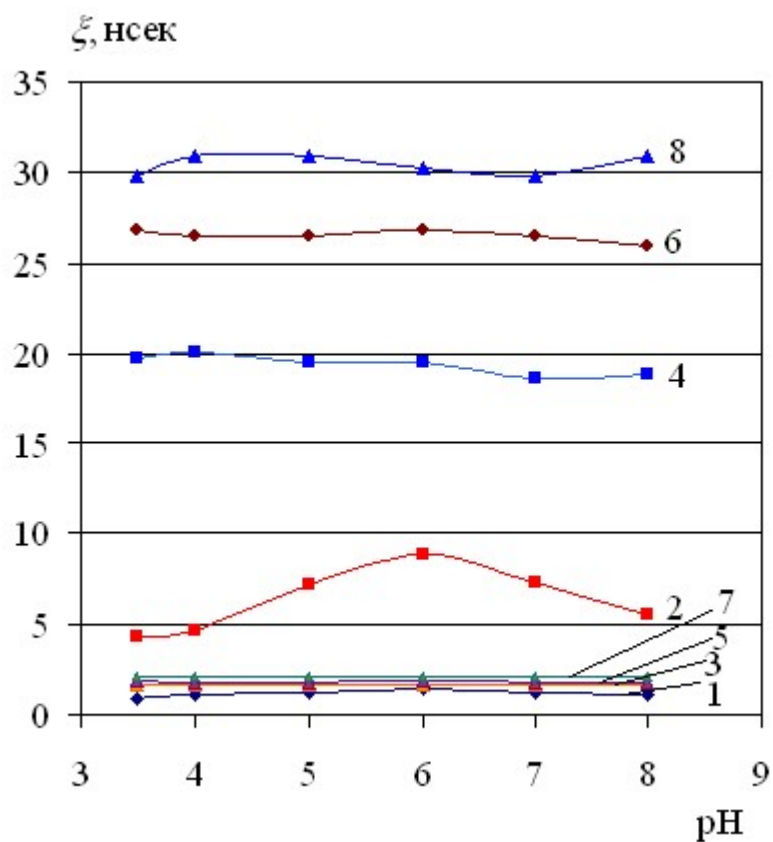


Рис. 3.3. Зависимость от рН времени вращательной релаксации наномаркеров: флуоресцеина (1, 2), эритрозина (3, 4), эозина (5, 6) и бенгальского розового (7, 8) в растворах без белка (1, 3, 5, 7) и в растворах 150 мкМ БСА (2, 4, 6, 8).

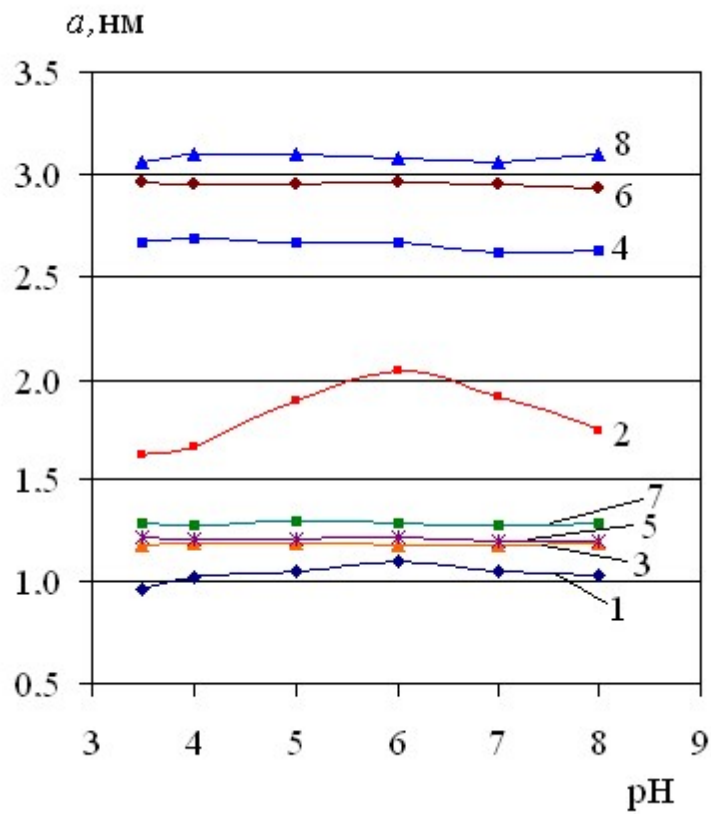


Рис. 3.4. Зависимость от pH эффективного радиуса наномаркеров: флуоресцеина (1, 2), эритрозина (3, 4), эозина (5, 6) и бенгальского розового (7, 8) в растворах без белка (1, 3, 5, 7) и в растворах 150 мкМ БСА (2, 4, 6, 8).

Наблюдаемый факт можно понять следующим образом. Наличие слабо электроотрицательных атомов водорода в формуле флуоресцеина приводит к тому, что основное влияние на вращательную диффузию маркера оказывают зависящие от значений рН процессы ионизации флуоресцеина, определяемые значениями его рК, и процессы его молекулярной ассоциации.

Коэффициент вращательной диффузии галоген-производных флуоресцеина не зависит от рН (в исследованном диапазоне рН 3,5 – 8,0). Наличие сильно электроотрицательных атомов (бром, йод, хлор) в структурных формулах маркеров приводит к независимости вращательной диффузии маркеров от рН.

В растворах без белка время вращательной релаксации ξ (рис. 3.3) наномаркеров семейства флуоресцеина, отражающее время разупорядочивания флуорофора вследствие тепловой диффузии, существенно меньше, чем в растворах БСА, при всех исследованных значениях рН (3,5 – 8,0).

Несвязанные с белком маркеры семейства флуоресцеина имеют небольшое время релаксации, меньшее времен жизни их флуоресценции, что приводит к слабой поляризации флуоресценции маркеров в растворах без белка. Связанные с БСА маркеры имеют время релаксации, большее времен жизни их флуоресценции, что дает увеличение поляризации их флуоресценции в растворах с БСА по сравнению с растворами без белка.

В работе также определены значения эффективного радиуса Эйнштейна a наномаркеров семейства флуоресцеина (рис. 3.4) как в растворах БСА, так и в растворах без белка при различных значениях рН.

Как видно, в растворах без белка эффективный радиус Эйнштейна маркера практически соответствует реальному размеру молекулы маркера, а в растворах с БСА эффективный радиус маркера является не реальным размером, а представляет собой эффективный размер, зависящий от процентного содержания связанного с белком маркера от его общего количества в растворе.

Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА, эффективный радиус молекул флуоресцеина, определяемый из вращательной диффузии, нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 6,0. В растворах без белка эффективный радиус флуоресцеина в среднем при различных рН равен 1,0 нм, а в растворах с белком возрастает примерно до 1,6 – 2,0 нм, что отражает его связывание с БСА, а также указывает на то, что далеко не весь наномаркер связывается с белком (радиус БСА порядка 4,0 нм).

Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА эффективный радиус молекул галоген-производных флуоресцеина, рассчитанный из вращательной диффузии, практически не зависит от рН (при $3,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$).

В растворах без белка эффективный радиус эритрозина в среднем при различных значениях рН равен 1,2 нм, а в растворах с БСА возрастает примерно до 2,6 – 2,7 нм. Следовательно, в растворах с БСА далеко не весь эритрозин связывается с белком (радиус БСА порядка 4,0 нм).

В растворах без белка эффективный радиус эозина в среднем при различных значениях рН равен 1,2 нм, а в растворах с БСА возрастает примерно до 2,9 нм. Следовательно, в растворах с БСА далеко не весь эозин связывается с белком.

В растворах без белка эффективный радиус бенгальского розового в среднем при различных значениях рН равен 1,3 нм, а в растворах с БСА возрастает примерно до 3,1 нм. Следовательно, в растворах с БСА далеко не весь бенгальский розовый связывается с белком.

§3.2. Сравнительный анализ вращательной диффузии исходного соединения флуоресцеина и его галоген-производных в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях рН

Проведенные в данной работе исследования наномаркеров семейства флуоресцеина указывают на существенное изменение характеристик этих наномаркеров в растворах БСА по сравнению с растворами без белка: в растворах с БСА увеличиваются степень поляризации флуоресценции

маркеров, увеличиваются время вращательной релаксации и эффективный радиус маркеров, при этом коэффициент вращательной диффузии маркеров уменьшается.

Столь заметное изменение характеристик данных маркеров семейства флуоресцеина при связывании их с БСА дает широкие возможности для использования их в качестве специализированных маркеров для БСА, в частности для исследования связывающих лекарственных сайтов БСА посредством взаимодействия с ними данных маркеров.

При сравнении наномаркеров семейства флуоресцеина между собой было обнаружено, что отличия в параметрах вращательной диффузии между маркерами определяются величиной электроотрицательности атомов в их структурных формулах. Увеличение электроотрицательности наблюдается в следующем направлении: водород (у флуоресцеина) – йод (у эритрозина) – бром (у эозина) – йод и хлор (у бенгальского розового). При сравнении поляризованной флуоресценции маркеров обнаружено, что увеличение электроотрицательности атомов в структурных формулах маркеров приводит к увеличению степени поляризации их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации, к увеличению их эффективного радиуса.

Поляризованная флуоресценция отражает эффективность связывания зонда с БСА от рН только для флуоресцеина, содержащего слабо электроотрицательные атомы водорода. Тогда как для галоген-производных флуоресцеина поляризованная флуоресценция отражает только факт самого связывания зонда с БСА, а не эффективность этого связывания при различных значениях рН, по причине наличия сильно электроотрицательных атомов в их структурных формулах и влияния их на вращательную диффузию зондов. Это указывает, что для регистрации факта связывания с БСА подходят все четыре зонда, но для исследований при вариации значений рН больше подходит исходное соединение данного ряда – флуоресцеин.

Глава 4. Определение констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с молекулами бычьего сывороточного альбумина по тушению флуоресценции наномаркеров

§4.1. Тушение Штерна – Фольмера флуоресценции наномаркеров добавлением в растворы бычьего сывороточного альбумина

Количественно связывание наномаркеров в качестве низкомолекулярных лигандов с макромолекулами белка описывается в терминах химической кинетики и физической химии.

При тушении флуоресценции маркера в растворах добавлением различных концентраций тушителя – белка можно записать:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [Q],$$
 где F_0 – интенсивность флуоресценции наномаркера в отсутствие тушителя (белка), F – интенсивность флуоресценции наномаркера в присутствии тушителя (белка), $[Q]$ – концентрация тушителя (белка), K – константа связывания наномаркера с белком (M^{-1}).

В данной работе рассматривается тушение флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина, обусловленное их связыванием с молекулами БСА.

В качестве примеров представлены спектры флуоресценции флуоресцеина (рис. 4.1), эритрозина (рис. 4.2), эозина (рис. 4.3) и бенгальского розового (рис. 4.4.) в растворах с различными концентрациями БСА при некоторых значениях рН.

По полученным спектрам флуоресценции маркеров в растворах с различными концентрациями БСА при различных значениях рН построены зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$, где F_0 – интенсивность флуоресценции маркера в отсутствие БСА, F – интенсивность флуоресценции маркера в присутствии БСА, $[Q]$ – концентрация БСА (для флуоресцеина – рис. 4.5, для эритрозина – рис. 4.6, для эозина – рис. 4.7, для бенгальского розового – рис. 4.8).

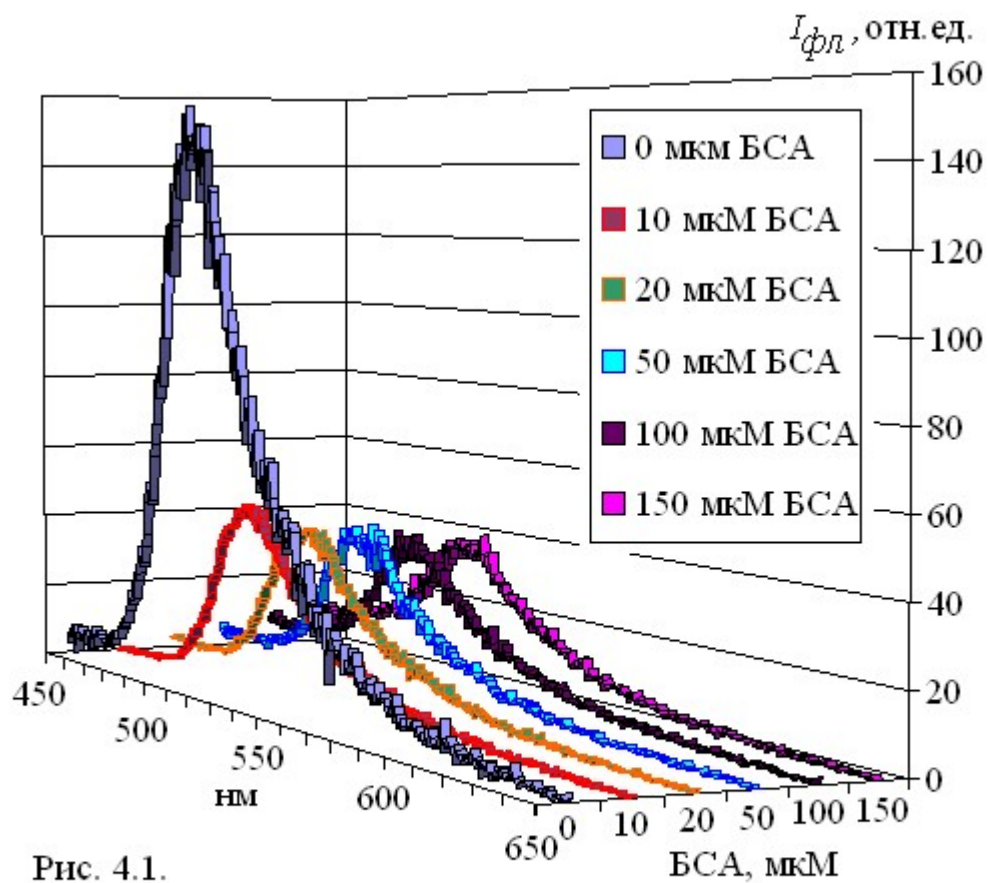


Рис. 4.1.

Спектры флуоресценции (возбуждение 440 нм) флуоресцеина (3 мкМ) в присутствии различных концентраций БСА в растворах при рН 5,0.

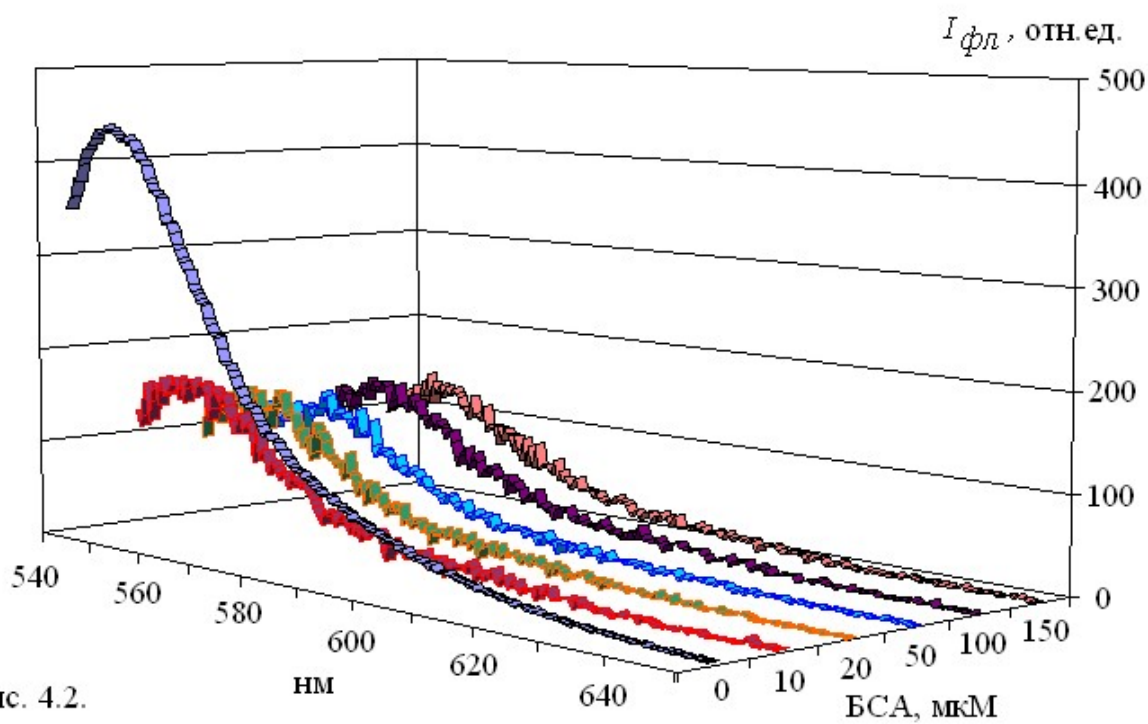


Рис. 4.2.

Спектры флуоресценции (возбуждение 530 нм) эритрозина (30 мкМ) в растворах с различными концентрациями БСА при рН 3,5.

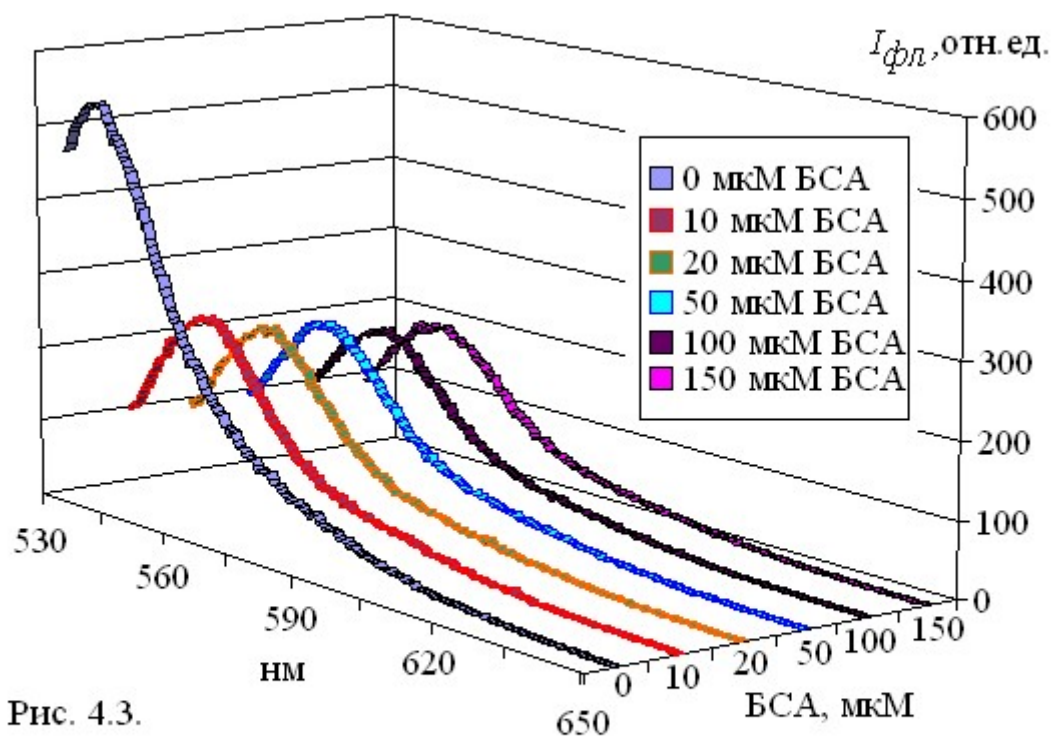


Рис. 4.3.

Спектры флуоресценции (возбуждение 520 нм) эозина (30 мкМ) в растворах с различными концентрациями БСА при рН 3,5.

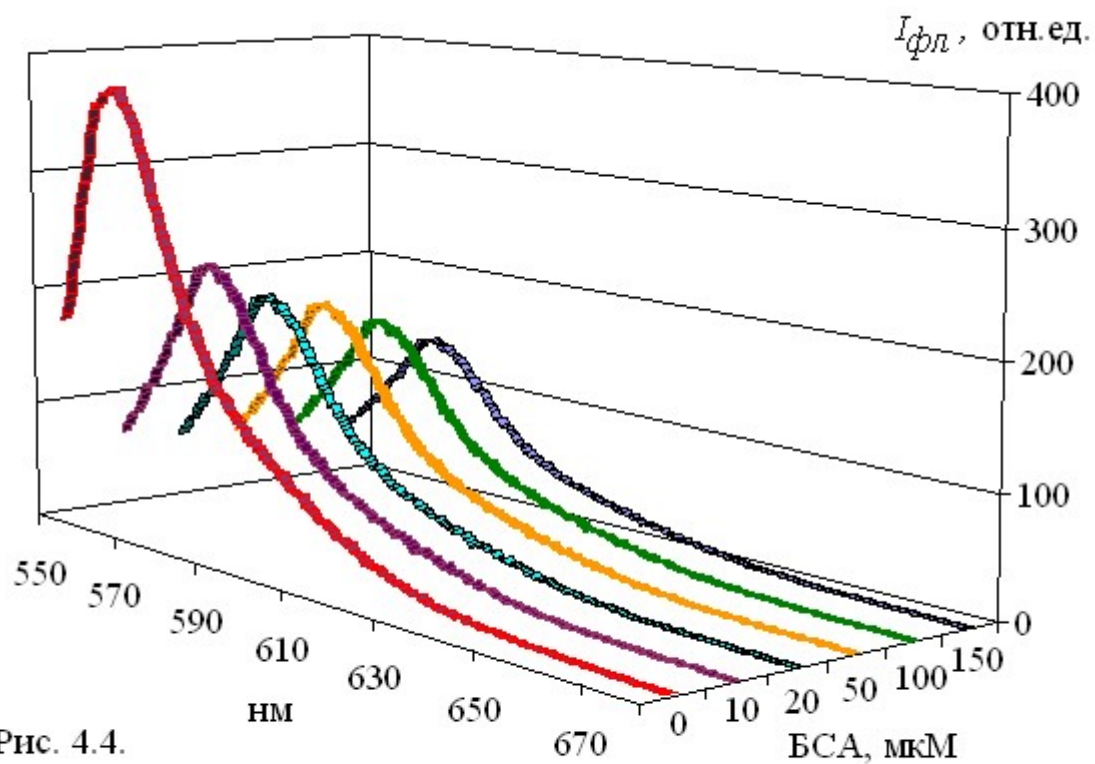


Рис. 4.4.

Спектры флуоресценции (возбуждение 540 нм) бенгальского розового (3 мкМ) в растворах с различными концентрациями БСА при рН 3,5.

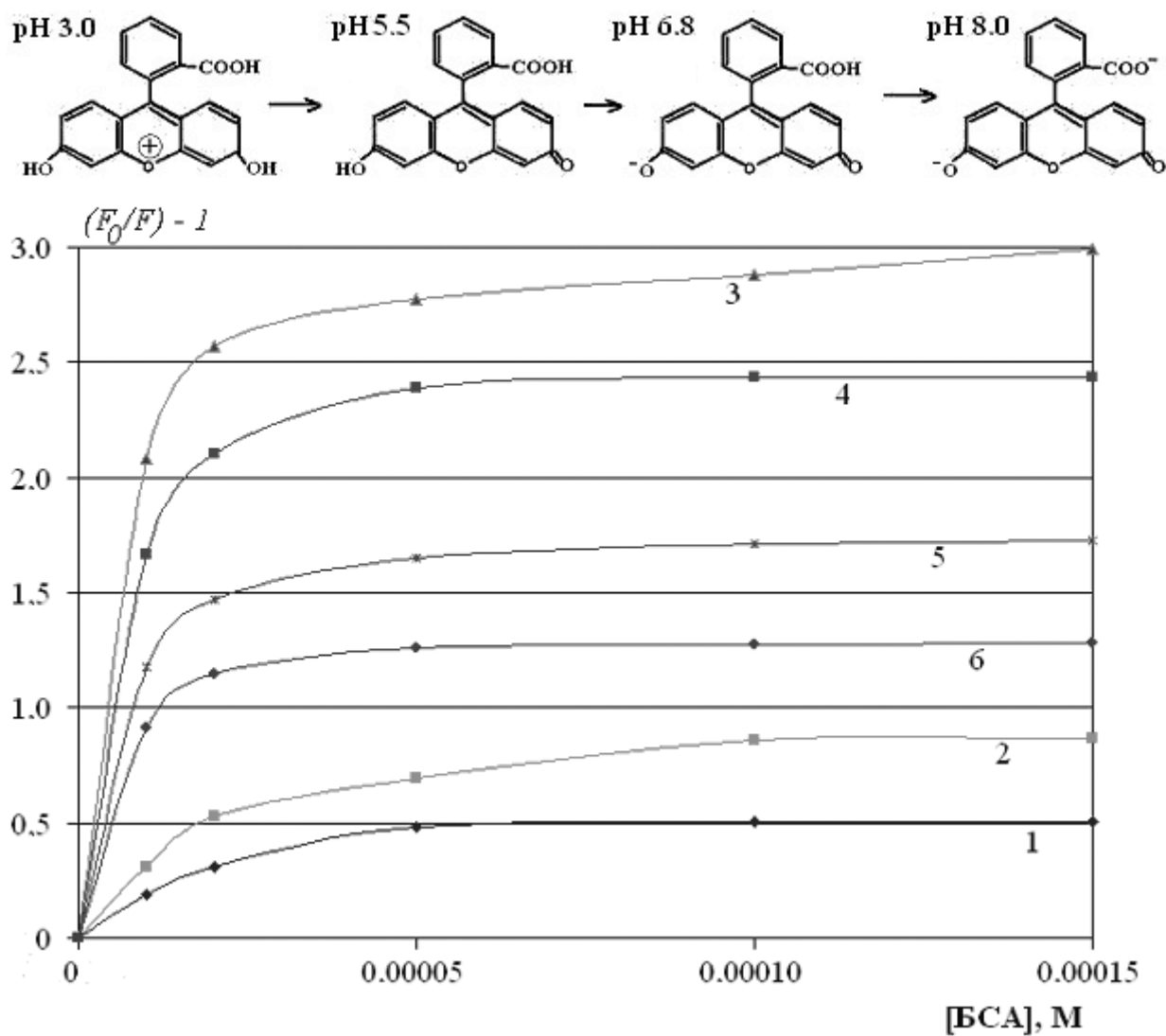


Рис. 4.5. Графики Штерна – Фольмера тушения флуоресценции флуоресцеина добавлением различных концентраций БСА при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

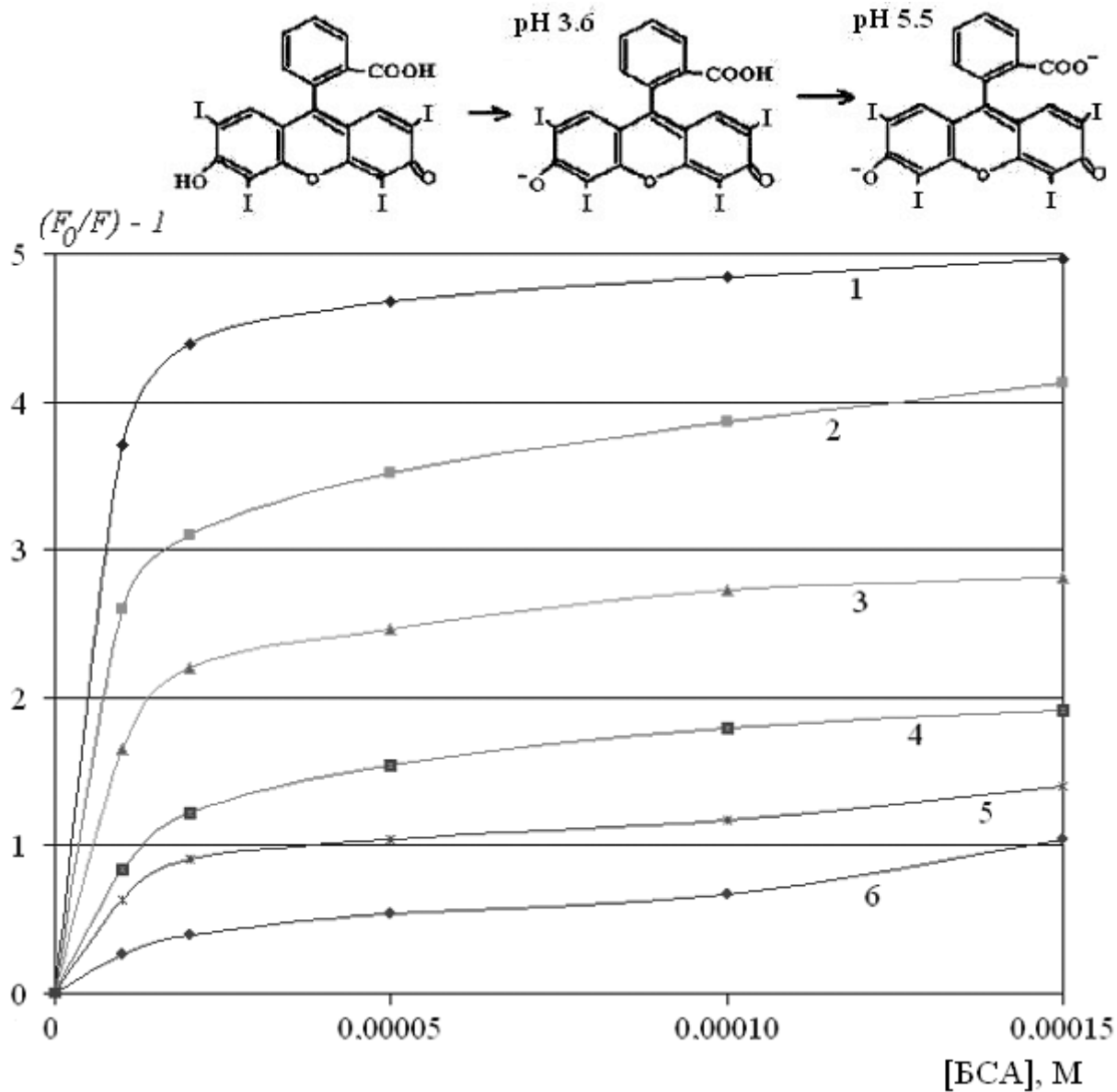


Рис. 4.6. Графики Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эритрозина добавлением различных концентраций БСА при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

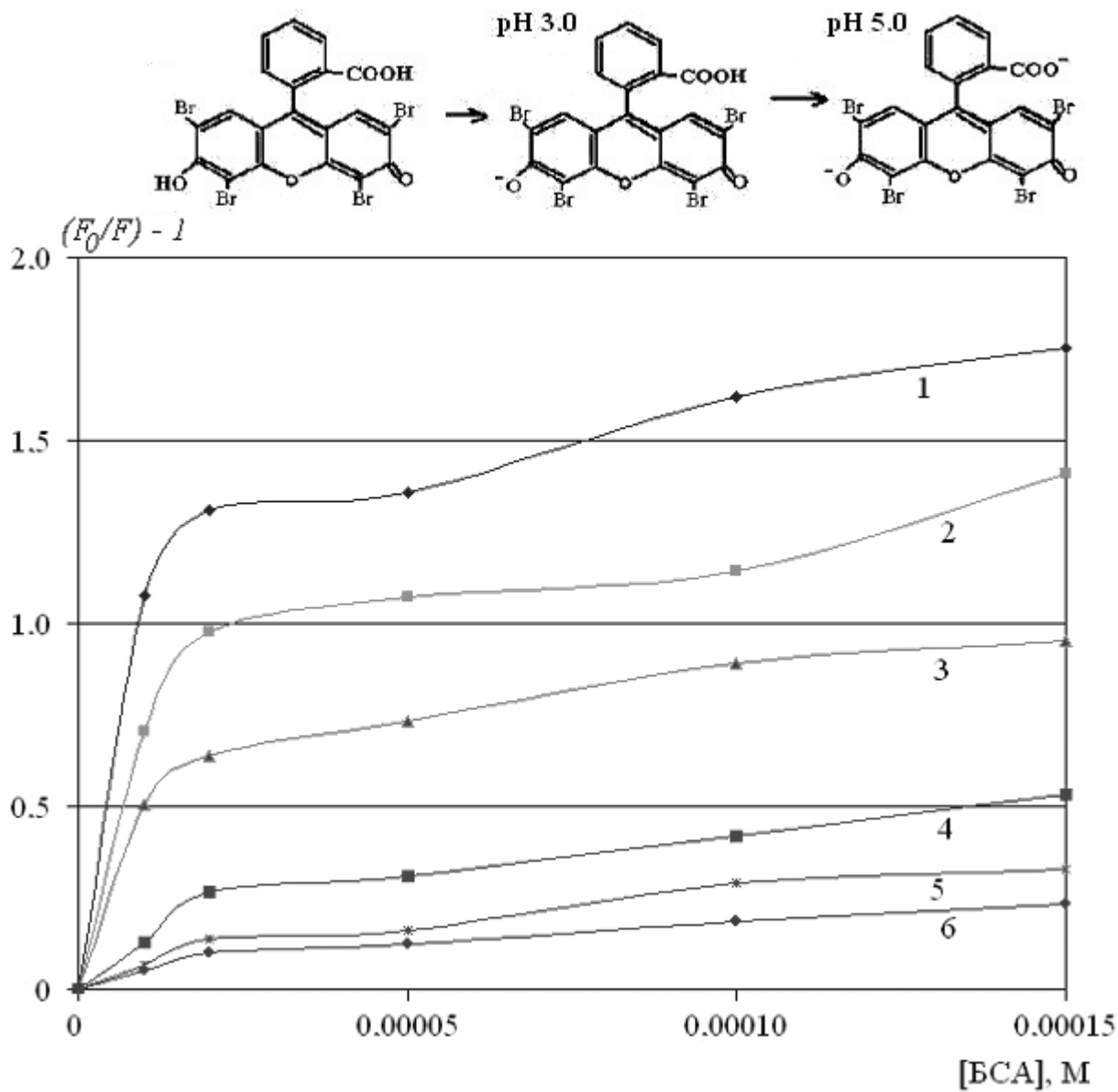


Рис. 4.7. Графики Штерна – Фольмера тушения флуоресценции эозина добавлением различных концентраций БСА при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

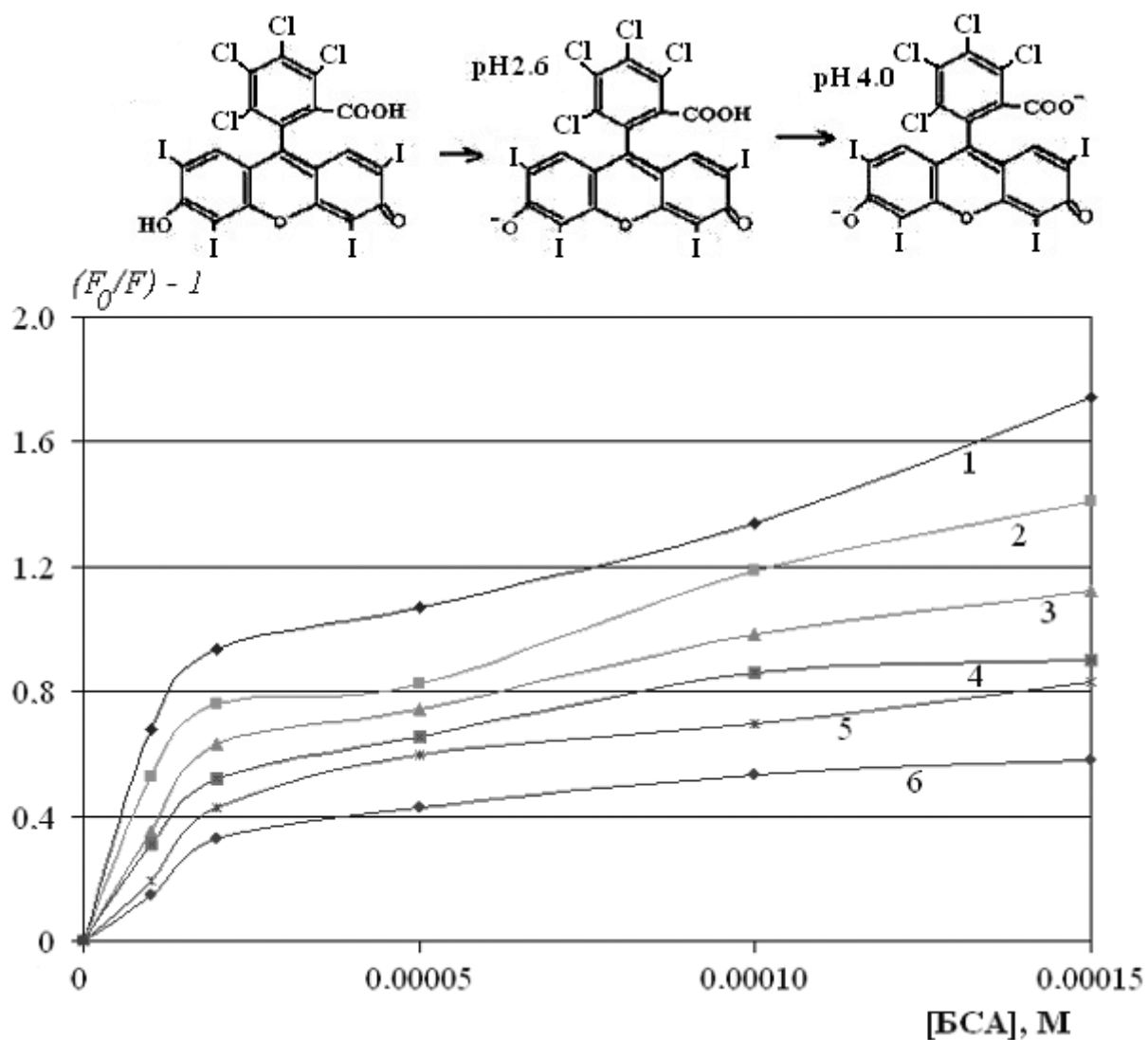


Рис. 4.8. Графики Штерна – Фольмера тушения флуоресценции бенгальского розового добавлением различных концентраций БСА при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 5,0 (3), 6,0 (4), 7,0 (5), 8,0 (6).

Видно, что полученные зависимости $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ имеют нелинейный характер. В растворах флуоресцентных наномаркеров с белком определяющую роль в тушении флуоресценции наномаркеров при взаимодействии с белком играет образование комплексов, и тушение флуоресценции статическое. В этом случае отклонения от линейности зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ объясняются несколькими типами механизмов (предположительно, ионного и ковалентного) образования комплексов наномаркеров с белком.

Определенные из тушения флуоресценции наномаркеров добавлением различных концентраций БСА константы тушения флуоресценции фактически ассоциируются с константами связывания наномаркеров с белком.

§4.2. Определение констант тушения флуоресценции наномаркеров в растворах БСА (констант связывания наномаркеров с БСА)

В работе рассмотрено три различных модели определения констант тушения флуоресценции наномаркеров при их взаимодействии с БСА.

1) Первая модель. Простая модель Штерна – Фольмера.

При тушении флуоресценции наномаркеров в растворах добавлением различных концентраций БСА можно согласно теории Штерна – Фольмера записать уравнение:

$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [Q]$, где K – константа тушения флуоресценции наномаркера, определяющая связывание каждого наномаркера с белком (M^{-1}).

Данная модель Штерна-Фольмера описывает линейную зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$. В данном нелинейном случае зависимостей для всех четырех наномаркеров (рис. 4.5 – 4.8) можно говорить только о линии тренда данных зависимостей и, соответственно, об эффективных константах тушения флуоресценции (константах тренда, K_{eff}) наномаркеров в растворах БСА, отражающих связывание наномаркеров с белком и усреднено

учитывающих все механизмы их взаимодействий, при различных значениях рН (табл. 1).

Таблица 1. Эффективные константы (в рамках Модели 1) тушения флуоресценции (K_{eff} , M^{-1}) наномаркеров в растворах БСА, отражающие связывание наномаркеров с белком.

рН	Флуоресцеин	Эритрозин	Эозин	Бенгал.роз.
3.5	2.93×10^3	19.94×10^3	10.22×10^3	9.11×10^3
4.0	4.91×10^3	18.62×10^3	8.67×10^3	7.75×10^3
5.0	22.53×10^3	13.21×10^3	7.74×10^3	6.31×10^3
6.0	20.44×10^3	10.12×10^3	6.02×10^3	5.18×10^3
7.0	7.42×10^3	6.92×10^3	5.11×10^3	4.85×10^3
8.0	6.37×10^3	5.84×10^3	4.42×10^3	3.43×10^3

Для флуоресцеина видно (табл. 1), что максимально эффективное связывание флуоресцеина с БСА имеет место при рН 5,0: когда молекулы флуоресцеина слабо положительно заряжены, а молекулы БСА слабо отрицательно заряжены (рI 4,9). Зависимость эффективной константы тушения флуоресценции флуоресцеина от рН имеет нелинейный вид с максимумом при рН 5,0, при этом видно в области более высоких значений рН ($> 5,0$) связывание происходит более эффективно по сравнению с областью низких значений рН ($< 5,0$).

Для эритрозина видно (табл. 1), что максимально эффективное связывание эритрозина с БСА имеет место при рН, меньших 5,0, т.е. когда белок в целом положительно заряжен, а эритрозин или находится в нейтральной форме или находится в форме моноаниона.

Для эозина видно (табл. 1), что максимально эффективное связывание эозина с БСА имеет место при значениях рН, меньших 5,0, когда молекулы белка в целом положительно заряжены, а эозин находится в форме моноаниона.

Для бенгальского розового (табл. 1) видно, что максимально эффективное связывание бенгальского розового с БСА имеет место при

значениях рН, меньших 5,0, когда молекулы белка в целом положительно заряжены, а бенгальский розовый находится в формах моноаниона или дианиона.

Из табл. 1 видно, что характер зависимости эффективной константы связывания наномаркера с БСА различается между флуоресцеином и его галоген – производными. Для флуоресцеина характерна нелинейная зависимость эффективной константы связывания его с БСА от рН с максимумом примерно при рН 5,0. Галоген – производные флуоресцеина характеризуются монотонно убывающей зависимостью эффективной константы связывания их с БСА от рН.

Из сравнения значений эффективных констант (модель 1, табл. 1) связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с БСА обнаружено, что наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного атома (увеличение электроотрицательности происходит в направлении: флуоресцеин – эритрозин – эозин – бенгальский розовый) приводит к уменьшению значений эффективных констант связывания наномаркера с БСА. Обнаружено, что в растворах БСА скорость убывания значений эффективной константы от значения рН уменьшается с увеличением электроотрицательности наномаркера.

2) Вторая модель. Разбивание зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ на два линейных случая.

Для более точного описания полученных зависимостей $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ их можно разложить в рамках Модели 2 на две составляющие – в области концентраций БСА < 20 мкМ и в области концентраций БСА > 20 мкМ – каждую из которых можно линейно аппроксимировать и получить, соответственно, две константы (табл. 2) тушения флуоресценции наномаркеров, отражающие различные виды взаимодействий наномаркеров с БСА.

Из табл. 2 видно, что обе константы тушения флуоресценции (K_1 и K_2) флуоресцеина имеют нелинейный характер с максимумом при рН 5,0, что

повторяет нелинейный характер зависимости эффективной константы (K_{eff}) тушения флуоресценции флуоресцеина, полученной в Модели 1.

Таблица 2. Константы (в рамках Модели 2) тушения флуоресценции (K_1 – в области концентраций БСА до 20 мкМ, K_2 – в области концентраций БСА больше 20 мкМ) наномаркеров в растворах БСА.

рН	Флуоресцеин		Эритрозин		Эозин		Бенгалроз	
	K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}	K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}	K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}	K_1, M^{-1}	K_2, M^{-1}
3.5	1.53×10^4	1.31×10^3	21.96×10^4	9.13×10^3	6.54×10^4	6.67×10^3	4.67×10^4	6.20×10^3
4.0	2.64×10^4	2.62×10^3	15.49×10^4	7.60×10^3	5.87×10^4	6.14×10^3	3.79×10^4	5.33×10^3
5.0	22.86×10^4	3.02×10^3	11.00×10^4	6.64×10^3	4.19×10^4	5.43×10^3	3.15×10^4	3.88×10^3
6.0	10.53×10^4	2.10×10^3	6.09×10^4	5.12×10^3	3.34×10^4	4.07×10^3	2.61×10^4	3.00×10^3
7.0	7.36×10^4	1.75×10^3	4.57×10^4	3.61×10^3	2.67×10^4	2.63×10^3	2.13×10^4	1.90×10^3
8.0	5.72×10^4	0.87×10^3	1.96×10^4	2.76×10^3	1.51×10^4	1.03×10^3	0.94×10^4	0.88×10^3

Также из данных табл. 2 видно, что обе константы тушения флуоресценции (K_1 и K_2) галоген-производных флуоресцеина имеют монотонно убывающий с ростом рН характер, что повторяет характер зависимости эффективной константы (K_{eff}) тушения их флуоресценции.

3) Третья модель. Описание зависимостей (F_0/F) – 1 сигмоидальной функцией.

При нелинейном характере зависимости (F_0/F) – 1 от $[Q]$ тушение флуоресценции наномаркеров в растворах добавлением различных концентраций белка можно записать следующим образом:

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

n – коэффициент кооперативности Хилла, K_{sigm} – константа тушения флуоресценции наномаркеров, фактически константа связывания наномаркеров с белком (M^{-1}), $K_{sigm} = \sqrt[n]{K}$.

В рамках данной Модели 3, основанной на использовании сигмоидальной (при $n < 1$) функции описания тушения флуоресценции,

определены константы тушения флуоресценции наномаркеров (табл. 3), отражающие их связывание с БСА, и коэффициенты кооперативности.

Таблица 3. Константы (в рамках Модели 3) тушения флуоресценции (K_{sigm}) маркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА, отражающие связывание маркеров с белком, где n – кооперативность.

рН	Флуоресцеин		Эритрозин		Эозин		Бенгалроз	
	K_{sigm}, M^{-1}	n	K_{sigm}, M^{-1}	n	K_{sigm}, M^{-1}	n	K_{sigm}, M^{-1}	n
3.5	0.09×10^4	0.29	63.82×10^4	0.34	39.34×10^4	0.13	1.38×10^4	0.57
4.0	0.54×10^4	0.32	34.60×10^4	0.35	5.06×10^4	0.13	0.61×10^4	0.45
5.0	44.54×10^4	0.16	17.02×10^4	0.32	0.56×10^4	0.27	0.37×10^4	0.37
6.0	39.59×10^4	0.14	3.53×10^4	0.39	0.09×10^4	0.31	0.07×10^4	0.34
7.0	29.82×10^4	0.13	0.92×10^4	0.57	0.04×10^4	0.35	0.03×10^4	0.24
8.0	1.60×10^4	0.12	0.54×10^4	0.91	0.02×10^4	0.41	0.01×10^4	0.23

Из табл. 3 видно, что зависимость константы K_{sigm} тушения флуоресценции флуоресцеина от рН имеет нелинейный характер с максимумом при рН 5,0. При этом в области более высоких значений рН (> 5,0) связывание наномаркеров с БСА происходит более эффективно по сравнению с областью низких значений рН (< 5,0).

Из данных табл. 3 видно, как и в предыдущих моделях, константы тушения флуоресценции галоген-производных флуоресцеина имеют монотонно убывающий характер с ростом рН, что указывает на сильное взаимодействие данных наномаркеров с белком при низких значениях рН.

При этом наличие в молекуле наномаркера более электроотрицательного атома приводит к уменьшению значений констант связывания K_{sigm} наномаркера с БСА при соответствующих значениях рН.

Из данных табл. 3 видно, что в связывание наномаркеров семейства флуоресцеина с БСА имеет место явление антикооперативности, которое связано с конкуренцией двух механизмов взаимодействия (ионного и ковалентного) наномаркеров с белком.

Перечисленные закономерности, обнаруженные в данной работе для растворов БСА, схожи с тем, что получено нами ранее для растворов САЧ в нашей лаборатории.

Однако нами найдены отличия в связывании наномаркеров семейства флуоресцеина с белком в растворах БСА от растворов САЧ: исходя из данных, полученных в Модели 1 и 2, при высоких значениях рН (6,0 – 8,0) галоген-производные флуоресцеина эффективнее связываются с БСА по сравнению с САЧ.

Также зарегистрированы отличия растворов БСА по сравнению с растворами САЧ в зависимостях эффективной константы связывания галоген-производных флуоресцеина от рН: скорость убывания значений эффективной константы от значения рН в растворах БСА существенно меньше, чем в растворах САЧ для каждого наномаркера, что указывает на то, что связывание данных наномаркеров с САЧ более сильно зависит от изменения значений рН, чем связывание этих наномаркеров с БСА.

Основные результаты и выводы работы

1. По анализу поляризованной флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА определены параметры вращательной диффузии наномаркеров при различных значениях рН: в растворах с БСА обнаружено увеличение степени поляризации флуоресценции зондов, увеличение времени вращательной релаксации зондов, при этом зарегистрировано уменьшение коэффициента вращательной диффузии этих зондов, что объясняется связыванием зондов с БСА.

2. Проанализировано влияние электроотрицательности атомов в структурных формулах наномаркеров на их характеристики: увеличение электроотрицательности атомов в наномаркерах приводит к увеличению степени поляризации их флуоресценции, к уменьшению коэффициента вращательной диффузии, к увеличению времени вращательной релаксации.

3. По анализу зависимостей параметров вращательной диффузии наномаркеров от рН показано, что для регистрации факта связывания с БСА подходят все четыре маркера семейства флуоресцеина, но для исследований БСА при вариации значений рН больше подходит флуоресцеин, содержащий в структурной формуле слабо электроотрицательные атомы водорода.

4. По тушению неполяризованной флуоресценции наномаркеров добавлением БСА с помощью трех различных моделей определены константы связывания наномаркеров с БСА при различных значениях рН: обнаружены как общие закономерности, так и отличия в связывании наномаркеров с БСА по сравнению с САЧ.

5. Определены различия в зависимостях констант связывания наномаркеров с БСА от рН: для флуоресцеина зависимость нелинейная, а у галоген-производных флуоресцеина – монотонно убывающая с ростом рН.

6. Обнаружено, что наличие в молекуле галоген-производных флуоресцеина более электроотрицательного атома приводит к уменьшению значений констант связывания наномаркера с БСА при соответствующих значениях рН.

Список цитируемой литературы

1. Левшин Л.В., Салецкий А.М. «Оптические методы исследования молекулярных систем», Москва, 1994.
2. Левшин Л.В., Салецкий А.М. «Люминесценция и ее измерения», Москва, 1989.
3. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии 1986, Москва, Мир.
4. Тиноко «Физическая химия Применение в биологических науках», Москва, Мир, 2002.
5. Шмидт В. «Оптическая спектроскопия для химиков и биологов», Москва, Мир, 2007.
6. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Под редакцией Грызунова Ю.А. и Добрецова Г.Е. Москва: ИРИУС, 1994.
7. Kamal J.K.A., Zhao L., Zewail A.H. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: human serum albumin. Proceeding of National Academy of Science of the USA, 2004, v. 101, № 37, p. 13411-13416.
8. Xie M.-X., Xu X.-X., Wang Y.-D. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. BBA, 2005, v. 1724, p. 215-224.
9. Zsila F., Bikadi Z., Simonyi M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modeling methods. Biochem. Pharmacol., 2003, v. 65, p. 447-456.
10. Laurence D.J.R. A study of the adsorption of dyes on bovine serum albumin by the method of polarization of fluorescence. Biochem. Journ., 1952, v. 51, p. 168-180.
11. Philip R., Penzkofer A., Baumler W., Szeimies R.M., Abels C. Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. Journ. of Photochemistry and Photobiology. A: Chem., 1996, v. 96, p. 137-148.
12. Sun C., Yang J., Li L., Wu X., Liu Y., Liu S. Advanced in the study of luminescence probes for proteins. Review. Journ. of Chromatography B, 2004, v. 803, p. 173-190.
13. Meadows F., Narayanan N., Patonay G. Determination of protein – dye association by near infrared fluorescence-detected circular dichroism. Talanta, 2000, v. 50, p. 1149-1155.
14. Ercelen S., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin. FEBS Letters, 2003, v. 538, p. 25-28.

15. Duchowicz R., Ferrer M.L., Acuna A.U. Kinetic spectroscopy of erythrosin phosphorescence and delayed fluorescence in aqueous solution at room temperature. *Photochem. Photobiology*, 1998, v. 68, p. 494-501.
16. Власова И.М., Землянский А.Ю., Салецкий А.М. Спектрально-люминесцентные характеристики эозина в растворах сывороточного альбумина человека при его денатурации под воздействием додецилсульфата натрия. *Журнал Прикладной Спектроскопии*, 2006, т. 73, № 5, с. 661-665.
17. Гаврилов В.Б. Определение параметров связывания флуоресцентного зонда пирронового красного с сывороточным альбумином человека. *Биофизика*, 2001, т. 46, № 1, с. 39-42.
18. Lee S.H., Suh J.K., Li M. Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile blue fluorescence. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, v. 24, № 1, p. 45-48.
19. Vlasova I.M., Saletsky A.M. Investigation of influence of different values of pH on mechanisms of binding of human serum albumin with markers of fluorescein family. *Journal Molecular Structure*, 2009, v. 936, p. 220-227.
20. Shrivastava H.Y., Nair B.U. A fluorescence-based assay for nanogram quantification of proteins using a protein binding ligand. *Anal. Bioanal. Chemistry*, 2003, v. 375, p. 169-174.
21. Abel R.L., Haigis M.C., Park C., Raines R.T. Fluorescence assay for the binding of ribonuclease A to the ribonuclease inhibitor protein. *Analytical Biochemistry*, 2002, v. 306, p. 100-107.
22. Vlasova I.M., Saletsky A.M. Spectroscopic investigations of binding of three fluorescent nanomarkers to bionanomolecules of human serum albumin in dependence on pH. *Current Applied Physics*, 2009, v. 9, p. 1027-1031.
23. Власова И.М., Бухарова Е.М., Салецкий А.М. Вращательная диффузия маркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека. *Журнал Физической Химии*, 2011, т. 85, № 5, с. 964-969.
24. Власова И.М., Гордеева Ю.А., Власов А.А., Салецкий А.М. Определение констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека. *Вестник МГУ. Серия 3. Физика. Астрономия*, 2012, № 2, с. 60-64.