

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

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА
студентки 605 группы
Даренской Татьяны Владимировны

**ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ДИФФУЗИЯ МОЛЕКУЛ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ В
РАСТВОРАХ С ИОННЫМ И НЕЙТРАЛЬНЫМ ДЕТЕРГЕНТАМИ**

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

Допущена к защите
«23» «декабря» 2011 года
Зав. каф. общей физики
профессор _____ А.М. Салецкий

Москва-2011

Оглавление

<u>Оглавление.....</u>	<u>2</u>
<u>Введение</u>	<u>3</u>
<u>Глава 1. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях взаимодействия белков и детергентов (литературный обзор)</u>	<u>5</u>
<u>§1.1. Физические основы поляризованной флуоресцентной спектроскопии</u>	<u>5</u>
<u>§1.2. Ионные и нейтральные детергенты.....</u>	<u>10</u>
<u>§1.3. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях взаимодействия белковых макромолекул с детергентами (сурфактантами)</u>	<u>12</u>
<u>Глава 2. Методическая часть экспериментов.....</u>	<u>17</u>
<u>§2.1. Приготовление растворов сывороточных альбуминов, содержащих додецилсульфат натрия (ДСН), Тритон X-100 и сахарозу.....</u>	<u>17</u>
<u>§2.2. Методика экспериментов для исследования поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточных альбуминов в растворах с ДСН и Тритоном X-100.....</u>	<u>17</u>
<u>Глава 3. Исследование вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ионного детергента ДСН при различных значениях pH (собственные результаты и их обсуждение).....</u>	<u>18</u>
<u>Глава 4. Исследование вращательной диффузии молекул сывороточных альбуминов при солюбилизации под действием нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях pH (собственные результаты и их обсуждение).....</u>	<u>28</u>
<u>§4.1. Определение параметров вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях pH.....</u>	<u>29</u>
<u>§4.2. Определение параметров вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях pH</u>	<u>42</u>
<u>Основные результаты и выводы.....</u>	<u>55</u>
<u>Список цитируемой литературы</u>	<u>56</u>

Введение

Белки играют центральную роль в реализации и регуляции практически всех процессов жизнедеятельности, протекающих в организмах на молекулярном уровне, поэтому проблема взаимосвязи структуры и функции белковых макромолекул является одной из центральных в современной науке. Для того чтобы белки эффективно осуществляли свои функции, необходима определенная стабильность белковой макромолекулы. Белковые макромолекулы способны претерпевать структурные перестройки под действием различных агентов.

В данной работе исследуются белки сывороточные альбумины – сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА). Бычий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин человека – глобулярные белки семейства альбуминов, изоэлектрическая точка БСА – pI 4,9 и САЧ – pI 4,7, молекулярная масса БСА – 64 кДа и САЧ – 66,4 кДа. Сывороточные альбумины представляют собой белки плазмы крови. Способность их молекул связывать обширный круг лигандов определяет одну из основных функций этих белков – транспорт физиологических метаболитов.

Основой взаимодействий молекул сывороточных альбуминов с лигандами является структурная подвижность этих белковых молекул, обеспеченная петлевой укладкой единственной полипептидной цепи каждого из белков, состоящей из 585 (САЧ) и 582 (БСА) аминокислотных остатков. Третичная структура обоих белков (САЧ и БСА) определяется тремя доменами, каждый из которых состоит из двух субдоменов. Оба белка являются типичными представителями белков семейства альбуминов и имеют схожее строение с небольшими различиями, в частности, в отличие от САЧ, имеющего один остаток триптофана (Trp 214), БСА имеет в своей аминокислотной цепи два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

В исследовании белков широко применяются детергенты, как ионные, так и нейтральные. Эффективными денатурирующими агентами являются ионные детергенты – вещества, содержащие гидрофобный углеводородный радикал и гидрофильную функциональную группу. Ярким примером денатурирующих агентов является анионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН). Разрыв большого количества слабых связей в молекуле белка приводит к разрушению её нативной конформации. Этот процесс носит название денатурации белков. При денатурации белков не происходит разрыва пептидных связей, т.е. первичная структура белка не нарушается. Денатурация, как правило, сопровождается утратой специфических функций белков, что обуславливает интерес к изучению механизмов белковой денатурации.

Нейтральные детергенты используют для выделения интегральных мембранных белков и получения их в активной биохимической форме, а также для перевода глобулярных водорастворимых белков из водной среды в липидную среду. Для этой цели необходимы детергенты, позволяющие солюбилизовать белки и сохранить их в растворе.

При солюбилизации происходит встраивание молекул белка в мицеллы детергента. Основная проблема в вопросах солюбилизации белков – это подбор оптимальных условий солюбилизации исследуемого белка. Ионные детергенты, денатурирующие белки (например, ДСН), не подходят для решения такой деликатной задачи. Для солюбилизации нужны такие детергенты, которые не нарушали бы вторичную и третичную структуры белка, а лишь связывались с гидрофобными участками белковой молекулы. Для солюбилизации белков необходимо учитывать заряд детергента (лучше нейтральный детергент), его ККМ (критическую концентрацию мицеллообразования) и размер мицелл детергента. Нейтральные детергенты, в основном, солюбилизируют белки, не повреждая их. Среди детергентов, часто применяющихся в биохимических, медицинских и фармацевтических исследованиях для солюбилизации белков, можно выделить нейтральный детергент Тритон X-100.

Целью данной работы является исследование по анализу триптофановой флуоресценции сывороточных альбуминов вращательной диффузии молекул этих белков в растворах с ионным (ДСН) и нейтральным (Тритон X-100) детергентами. В рамках данной цели поставлены следующие задачи:

1. по анализу поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека исследовать вращательную диффузию молекул этого белка в растворах анионного детергента ДСН и получить информацию о механизме денатурации альбумина человека под действием ДСН при различных значениях pH;

2. по анализу поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточных альбуминов человека и быка исследовать вращательную диффузию молекул этих белков в растворах нейтрального детергента Тритона X-100 и получить информацию о солюбилизации сывороточных альбуминов с помощью этого нейтрального детергента при различных значениях pH.

Эти исследования чрезвычайно важны в связи с физиологическими функциями сывороточных альбуминов в крови, т.к. позволяют делать выводы об уровне сохранения нативной конформации белков и, следовательно, о сохранности их функциональных свойств в различных условиях, в частности, в растворах, содержащих детергенты, наиболее часто используемые в биохимических, медицинских и фармацевтических задачах.

Глава 1. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях взаимодействия белков и детергентов (литературный обзор)

§1.1. Физические основы поляризованной флуоресцентной спектроскопии

Свечение вещества, возникающее при переходе молекул из возбужденного состояния в основное, называют люминесценцией [1]. Если возбуждение происходило за счёт поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения в процессе релаксации носит название фотолюминесценции.

Люминесценция (рис. 1.1) подразделяется на два вида (флуоресценцию и фосфоресценцию) в зависимости от характера электронного состояния, из которого молекулы переходят в основное состояние с испусканием электромагнитного излучения [1-3]. При переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность, наблюдается флуоресценция: 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 характеризуется отсутствием длительного «послесвечения». 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. 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.

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.

Для явления флуоресценции известно несколько основных характеристик. Спектр испускания флуоресценции представляет собой зависимость интенсивности испускания от длины волны (или волнового числа) при фиксированной длине волны возбуждающего света. Спектром возбуждения называют зависимость интенсивности испускания флуоресценции от длины волны (или волнового числа) возбуждающего света при постоянном потоке фотонов, падающих на образец. Длина волны испускания при регистрации спектра возбуждения остается неизменной, а значения длины волны возбуждения (волновых чисел линии возбуждения) пробегают значения заданного диапазона.

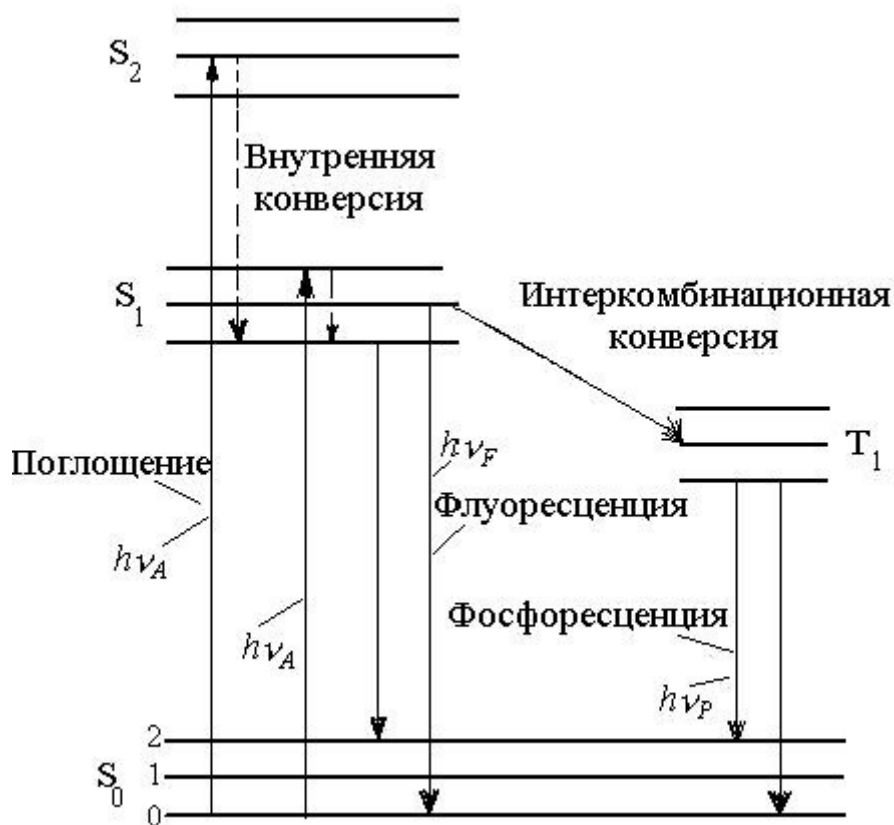


Рис. 1.1. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

Полоса флуоресценции смещена в область более низких частот по сравнению с полосами поглощения. Данное соотношение $\nu_{ногл} > \nu_{фл}$ носит название закона Стокса-Ломмеля, а длинноволновое (красное) смещение полосы испускания относительно поглощаемой частоты называется стоксовым. Иногда этот закон нарушается, и тогда наблюдаются компоненты полосы флуоресценции со стороны более высоких частот относительно частоты 0-0-полосы поглощения, носящие название антистоксовых.

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 флуоресценции названо по имени его первого исследователя правилом Левшина.

Выход люминесценции отражает эффективность преобразования веществом возбуждающего излучения в свет люминесценции. Разделяют энергетический ($\Gamma = E_{исл}/E_{ногл}$) и квантовый ($\gamma = N_{исл}/N_{ногл}$) выходы люминесценции, где Γ - энергетический выход, $E_{исл}$ -

испускаемая при люминесценции энергия, $E_{\text{пол}} -$ поглощенная энергия, $\gamma -$ квантовый выход, $N_{\text{исп}} -$ число квантов люминесценции, испускаемых единицей объема вещества в единицу времени, $N_{\text{пол}} -$ число поглощенных фотонов возбуждающего излучения.

Энергетический и квантовый выходы люминесценции связаны между собой соотношением:

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

где $v_{\text{люм}} -$ средняя частота полосы люминесценции, $v_{\text{возб}} -$ частота возбуждающего излучения. Так как $v_{\text{люм}} < v_{\text{возб}}$, то энергетический выход люминесценции меньше квантового $\Gamma < \gamma$.

С.И. Вавилов установил зависимость энергетического выхода люминесценции от длины волны возбуждающего света, в соответствии с которой энергетический выход люминесценции первоначально растет пропорционально длине волны возбуждающего света, затем в некотором интервале длин волн остается постоянным, после чего резко падает. Эта зависимость получила название закона Вавилова.

Молекулы флуоресцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому флуоресцентное излучение каждой отдельной молекулы поляризовано. Однако, если анизотропные молекулы ориентированы хаотически, то вещество в целом становится изотропным, а его флуоресценция – неполяризованной.

Дипольные моменты переходов имеют вполне определенную ориентацию внутри молекулы. При возбуждении поляризованным светом преимущественно возбуждаются те молекулы, дипольные моменты которых параллельны вектору напряженности электрического поля падающего света. Это селективное возбуждение ориентированного ансамбля молекул приводит к частично поляризованной флуоресценции (рис. 1.2), которая описывается степенью поляризации и анизотропии флуоресценции.

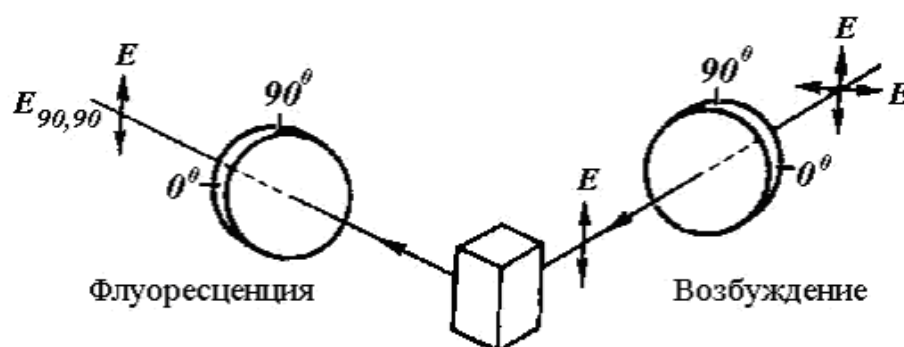


Рис. 1.2. Схема измерения поляризованной флуоресценции.

Интенсивность флуоресценции в произвольном направлении можно представить в виде суммы двух световых потоков I_{\parallel} и I_{\perp} , поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям, где I_{\parallel} и $I_{\perp} -$ интенсивности флуоресценции,

измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света.

Для количественной оценки поляризованной флуоресценции вводится понятие степень поляризации флуоресценции:

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}, \text{ где } I_{||} \text{ и } I_{\perp} - \text{соответственно параллельная и перпендикулярная}$$

электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции. Существует и иная характеристика поляризованной флуоресценции – степень анизотропии излучения:

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

Измерение степени анизотропии флуоресценции широко используется в биохимических исследованиях. Это происходит потому, что любые факторы, которые влияют на размер, форму и сегментальную гибкость макромолекулы, будут влиять на наблюдаемую анизотропию. Вышеперечисленные свойства макромолекул могут изменяться под воздействием рН, температуры, вязкости, денатурирующих агентов и из-за реакций ассоциации [3].

Количественная теория вращательной деполяризации была предложена В.Л. Левшиным и Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии.

В общем случае степень анизотропии в любой момент времени равна

$$r(t) = (I_{||}(t) - I_{\perp}(t)) / (I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t)).$$

При $t=0$ $r(0)$ определяется по формуле Левшина - Перрена:

$$r = 1/5(3\cos 2\alpha - 1).$$

Яблонским А. было показано, что степень анизотропии описывается экспоненциальной функцией:

$$r(t) = r_0 \exp(-6 D_{\text{вращ}} t),$$

где $D_{\text{вращ}}$ – вращательный коэффициент диффузии. Учитывая, при стационарном возбуждении закон затухания люминесценции также является экспоненциальным, получим

$$r = \frac{r_0}{\tau_0} \int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{\tau_0} \cdot (1 + 6 \cdot D_{\text{вращ}} \tau_0)\right) dt = r_0 / (1 + 6 \cdot D_{\text{вращ}} \tau_0),$$

где τ_0 – среднее время жизни возбужденных молекул. Коэффициент вращательной диффузии $D_{\text{вращ}}$, определенный в рамках модели Эйнштейна-Дебая-Стокса (гидродинамическое приближение), имеет вид:

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

где T – абсолютная температура, η – вязкость раствора, V – объем раствора, k – постоянная Больцмана. С учетом этой формулы:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{kT\tau_0}{V\eta} \right).$$

Или в обозначениях степени поляризации:

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

где P_0 – предельная степень поляризации люминесценции. Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. 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:

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

этот тангенс при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема, и, наоборот, по известному молекулярному объему можно определить значение среднего времени жизни возбужденного состояния исследуемых молекул.

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

$$\xi = \frac{4a^3\pi\eta}{3Tk} = \frac{V\eta}{Tk}, \text{ где } a \text{ – средний гидродинамический радиус Эйнштейна } \left(V = \frac{4\pi a^3}{3} \right).$$

Согласно Левшину, Перрену и Яблонскому, для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + 6D_{\text{вращ}} \cdot \tau,$$

где r_0 – анизотропия для неподвижного флуорофора (зонда), $D_{\text{вращ}}$ – коэффициент вращательной диффузии, τ – время жизни возбужденного состояния флуорофора.

Условия вывода формулы вращательной деполяризации Левшина- Перрена:

1. изотропное распределение молекул;
2. дипольный характер их излучения;
3. экспоненциальность и пространственная однородность затухания люминесценции отдельных молекул;
4. гидродинамическое описание броуновского движения.

§1.2. Ионные и нейтральные детергенты

Детергенты – это поверхностно-активные вещества, концентрирующиеся на поверхности раздела фаз, вызывающие снижение поверхностного натяжения. Детергенты представляют собой органические амфифильные соединения, молекулы которых имеют гидрофильные и гидрофобные участки [4]. На границе фаз молекулы детергентов ориентируются энергетически наиболее выгодным образом: гидрофильные (полярные) группы – в сторону полярной (обычно водной) фазы, гидрофобные (длинные углеводородные цепи) – в сторону неполярной фазы.

По типу гидрофильных групп различают несколько групп детергентов – ионные и неионные. Ионные детергенты диссоциируют в растворе на ионы, одни из которых поверхностно активны, а другие (противоионы) – нет. В зависимости от знака заряда поверхностно-активного иона ионные детергенты делят на анионные, катионные и амфотерные.

В водных растворах благодаря межмолекулярным силам происходит ассоциация молекул детергентов с образованием мицелл. В мицеллах в водной среде углеводородные цепи обращены друг к другу и образуют нечто вроде капли неполярного вещества, а ионные группы обращены в воду и экранируют углеводородную каплю. В неполярной среде мицеллы имеют обратное строение (обратные мицеллы). Равновесие между мицеллами и отдельными молекулами зависит от концентрации, температуры, величины рН, наличия электролитов в растворе.

Именно благодаря наличию гидрофобного ядра мицеллы способны солюбилизировать, то есть переводить в раствор неполярные вещества, практически нерастворимые в воде.

В качестве параметров, характеризующих способность детергентов к мицеллообразованию, обычно используют критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) и число агрегации. ККМ — это та концентрация, при которой детергент начинает образовывать мицеллы. До этого он находится в воде в мономерной форме в состоянии истинного раствора. Для ионных детергентов величины ККМ составляют несколько миллимолей, а для неионных эта характеристика на порядок ниже. Число агрегации показывает, сколько молекул детергента приходится на одну мицеллу.

Основную долю в фармацевтических, косметических, медицинских и биохимических исследованиях составляют анионные детергенты, с их помощью влияют на энергетическое состояние и структуру межфазной поверхности и через неё регулируют свойства микрогетерогенных систем. Обычные мыла представляют собой один из классов анионных детергентов. Анионные детергенты содержат отрицательно заряженные группы

SO₃⁻, OSO₃⁻, OPO₃⁻, COO⁻ и другие, а в качестве нейтрализующих противоионов – ионы натрия или калия.

Благодаря высокой поверхностной активности и способности к растворению белков и липидов, а также способности вызывать диссоциацию и денатурацию белков, инактивацию вирусов и токсинов именно анионные детергенты широко применяются для приготовления медицинских фармацевтических препаратов (например, бактерицидных и дезинфицирующих), а также дерматологических и косметических средств.

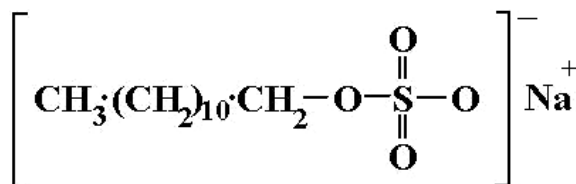


Рис. 1.3. Структурная формула додецилсульфата натрия (ДСН).

Одним из широко применяющихся детергентов в медицинских, косметических и фармацевтических исследованиях является анионный детергент додецилсульфат натрия ДСН (рис. 1.3). Критическая концентрация мицеллообразования ДСН равна 8,16 мМ, агрегационное число – 55-62. При определенных концентрациях ДСН является денатурирующим белковые молекулы детергентом.

Неионные ПАВ растворяются в воде, не ионизируясь. Растворимость таких детергентов в воде обуславливается наличием в них функциональных групп. Как правило, они образуют клатраты в водном растворе вследствие возникновения водородных связей между молекулами воды и атомами кислорода полиэтиленгликолевой части молекулы ПАВ. К ним относятся: полигликолевые эфиры жирных спиртов и кислот, полигликолевые эфиры амидов жирных кислот, ацилированные или алкилированные полигликолевые эфиры алкиламидов.

Ярким представителем неионных ПАВ является Тритон X-100 (рис. 1.4). Критическая концентрация мицеллообразования Тритона X-100 равна 0,25 мМ, агрегационное число – 140. Данный детергент является эффективным детергентом для солюбилизации белков: добавление этого детергента в раствор улучшает растворимость белка, при этом не вызывая его денатурацию.

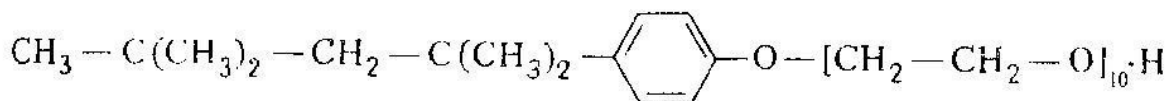


Рис. 1.4. Структурная формула Тритон X-100.

Конечной целью солюбилизации является встраивание белка в детергентные мицеллы. Основная задача – это подбор оптимальных условий солюбилизации белка. Детергенты, денатурирующие белки не подходят для решения этой деликатной задачи. Для систематизации подбора детергента существует параметр, называемый гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ). Этот параметр, изменяющийся от 1 до 20, используется при получении сурфактантов в качестве меры относительной гидрофобности. Детергенты (сурфактанты) со значением ГЛБ от 12,5 до 14,5 являются наиболее эффективными растворителями – солюбилизаторами интегральных мембранных белков. ГЛБ Тритона X-100 равно 13,5.

§1.3. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях взаимодействия белковых макромолекул с детергентами (сурфактантами)

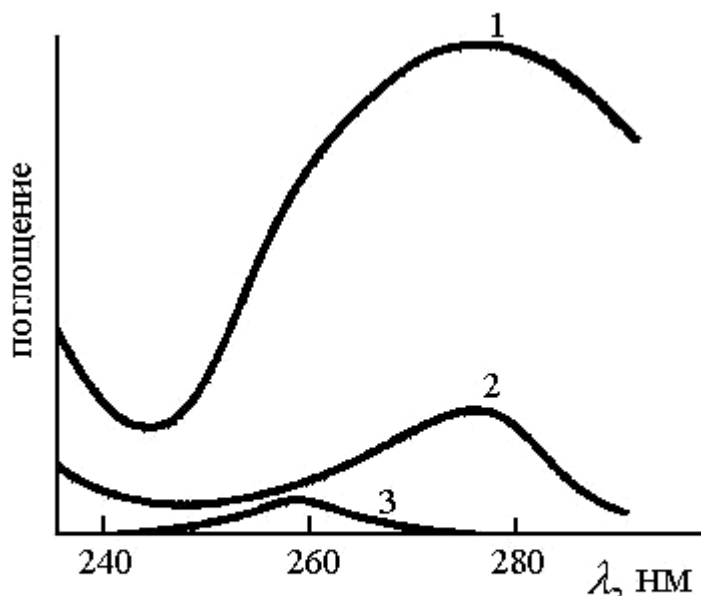
Изучение вида спектров флуоресценции, их интенсивности нашло широкое применение в медицинских и биологических исследованиях.

Собственная флуоресценция простых белков (максимумы флуоресценции в области 340-360 нм) обусловлена наличием ароматических аминокислот – фенилаланина, триптофана и тирозина.

Максимумы флуоресценции фенилаланина, тирозина и триптофана имеют место при 282, 303, 348 нм соответственно при возбуждении в максимумах их поглощения (фенилаланин – 258 нм, тирозин – 276 нм, триптофан – 280 нм).

Максимум флуоресценции триптофана варьирует от 330 до 350 нм в зависимости от локализации триптофана в белковой молекуле. Положение максимума флуоресценции триптофана может изменяться при варьировании рН среды от 340 до 350 нм.

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.



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

Обнаружено, что положение максимума триптофановой флуоресценции различно у разных белков. В качестве примера, можно привести положение максимумов триптофановой флуоресценции (возбуждение 280 нм) ряда белков (в водных растворах): инсулин (304 нм), рибонуклеаза (304 нм), лизоцим (341 нм), трипсин (332 нм), трипсиноген (332 нм), химотрипсиноген (330 нм), сывороточный альбумин человека (339 нм), бычий сывороточный альбумин (330 нм), яичный альбумин (328 нм), пепсин (342 нм), фибриноген (337 нм) [5].

При одновременном наличии в белке и триптофанового, и тирозинового аминокислотных остатков спектр флуоресценции этого белка можно разложить на две составляющие: тирозиновую и триптофановую. Флуоресценция всех белков определяется исключительно флуоресценцией тирозиновых и триптофановых аминокислотных остатков. Флуоресценцию белков обычно возбуждают светом с длиной волны 280 нм, поэтому вклад фенилаланина в белковую флуоресценцию практически отсутствует.

Положение максимума спектра флуоресценции белков изменяется при изменении рН. Исследования рН-зависимостей белковой флуоресценции позволяют установить область нативности белка в шкале рН и изучить возможные рН-индуцируемые конформационные изменения в пределах нативной структуры белка.

Изменения ионизации белковых групп запускают конформационные изменения в белках, которые могут менять окружения белковых хромофоров и, следовательно, вызывать изменения белковой флуоресценции. Но могут быть также ситуации, когда

изменения ионизации белковых групп не вызывают существенных изменений конформаций белка, но вызывают изменения белковой флуоресценции, поскольку ионизированные группы расположены в ближайшем окружении белковых хромофоров. В этом случае изменения флуоресценции отражают изменения тушащих и релаксационных свойств ближайших групп окружения хромофоров. Следует различать эти две ситуации.

На спектры флуоресценции белков оказывают влияние различные внешние факторы, такие как температура и рН раствора. Следовательно, параметры белковой флуоресценции могут быть использованы для определения различных физических и физико-химических характеристик белков. При исследовании физико-химических свойств нового белка необходимо выяснить его стабильность в отношении действия таких универсальных внешних факторов, как температура, рН и ионная сила растворов.

Методы флуоресцентного анализа в исследованиях белков применяются для определения изменения вторичной структуры белков под влиянием внешних факторов [6], под воздействием лекарственных препаратов [7], для оценки окислительных повреждений белков [8], для исследования белковой денатурации [9], при диагностике заболеваний [10], в исследованиях белковых конъюгатов [11]. Конформационные изменения белков, участвующих в метаболических процессах в человеческом организме, могут свидетельствовать о наличии в нем серьезных патологических изменений. В [12] даже исследуют расстройства человеческой психики посредством изучения изменений в конформации САЧ флуоресцентными методами.

В [13] методом флуоресцентной спектроскопии изучены структурные изменения сывороточного альбумина человека, индуцированные низкими температурами в водно-диметилсульфоксидных (ДМСО) растворах. Показано, что при режиме быстрого замораживания/оттаивания в растворах, содержащих ДМСО (до 20%), белок не подвергается резким структурным изменениям.

Динамика конформационных перестроек белковых молекул под действием денатурирующих агентов также изучается методами флуоресцентной спектроскопии по триптофановой флуоресценции [14].

В [15-17] исследована триптофановая флуоресценция сывороточного альбумина человека при денатурации под действием анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН).

В [18] представлены исследования тушения собственной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина под действием алкилпиридиновых катионов. Исследовано тушение собственной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина при добавлении в раствор катионного сурфактанта – хлорида

цетилпиридинума. По полученным спектрам флуоресценции определены константы связывания сурфактанта и белка. Определены зависимости связывания сурфактанта с белком от величины рН раствора. При увеличении рН хлорид цетилпиридиния интенсивнее связывается с молекулами альбумина, что приводит к более сильному тушению собственной белковой флуоресценции.

В [19] проведены исследования взаимодействия человеческого и бычьего сывороточного альбумина с 1-циан-этил-5-хлор-урацилом (СЕСУ) различными методами в том числе, методами флуоресцентной спектроскопии. Результаты флуоресцентных измерений показали, что СЕСУ обладает высокой способностью к тушению собственной флуоресценции как САЧ, так и БСА путем статического тушения.

В [20] исследовано взаимодействие САЧ и неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) Твин-80. Комплексообразование происходит за счет образования водородных связей между Твин-80 и белком. Определены растворимость в воде и поверхностная активность комплекса Твин-80-белок (состав 1:1). При молярном отношении ПАВ/белок в диапазоне 6-10 наблюдалось дополнительное связывание белком молекул Твина-80 за счет гидрофобных взаимодействий.

В [21] методами флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма изучены характеристики процессов сворачивания и разворачивания двух модельных белков, овальбумина и α -лактальбумина. Замечено, что процесс разворачивания овальбумина и α -лактальбумина включает в себя три стадии, в том числе переходное состояние с высокой гидрофобностью поверхности. Переходное состояние охарактеризовано с помощью спектроскопических методов. Обнаружено, что в переходном состоянии сохраняется практически та же вторичная структура, что и в нативном белке. С использованием тех же методов проведено исследование процесса рефолдинга (сворачивания). Показано, что рефолдинг α -лактальбумина обратим и происходит через образование сходного типа интермедиатов, что и в процессе разворачивания. Однако при рефолдинге из денатурированного состояния, полученного с помощью гидрохлорида гуанидина, овальбумин приходит к другому свернутому состоянию.

Кроме собственной флуоресценции белка часто проводят исследования с использованием молекулярных флуоресцентных красителей – наномаркеров. В [22] описаны флуоресцентные наномаркеры, применяемые в исследованиях белковых макромолекул.

В [23, 24] из анализа спектров флуоресценции наномаркера эозина, находящегося в растворе с сывороточным альбумином человека, получена информация о динамике

белковых конформационных перестроек при денатурации белка под воздействием додецилсульфата натрия.

В [25] проведено исследование для определения микрограммовых количеств бычьего сывороточного альбумина по изменениям спектров флуоресценции альбумина в комплексе с красителем нильским синим. Для увеличения интенсивности в раствор добавлялся Тритон X-100. Определен диапазон длин волн, в котором интенсивность флуоресценции Нильского Синего линейно связана с концентрацией бычьего сывороточного альбумина.

В [26] спектроскопическими методами был исследован механизм связи красителя бенгальского розового с бычьим сывороточным альбумином. Анализ результатов флуоресценции показал присутствие обоих динамического и статического механизмов тушения флуоресценции красителя в растворах белка.

В [27, 28] проведен анализ флуоресцентных характеристик и процессов ассоциации в растворах альбумина человека при различных рН трех флуоресцентных зондов (эозина, эритрозина и флуоресцеина) и показано, что общими чертами для всех трех зондов при добавлении в раствор белка являются тушение и красный сдвиг максимума флуоресценции, при этом между флуоресцеином и его галоген – производными наблюдаются отличия в зависимостях флуоресценции и степени ассоциации от рН.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов сывороточных альбуминов, содержащих додецилсульфат натрия (ДСН), Тритон X-100 и сахарозу

Растворы сывороточного альбумина человека и бычьего сывороточного альбумина приготовлены разведением белка до концентрации 5 мкМ в двух буферных системах: 0,1 М $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{KOH}$ (рН 3,5 – 5,0) и 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1 \text{ M NaOH}$ (рН 5,5 – 8,0).

К растворам сывороточного альбумина человека добавлены различные концентрации ДСН (0,5 – 7,0 мМ) при различных значениях рН (3,5 – 6,0).

К растворам сывороточного альбумина человека и бычьего сывороточного альбумина добавлены различные концентрации Тритона X-100 (0,1 – 0,7 мМ) при различных значениях рН (3,5 – 8,0).

Для варьирования вязкости в итоговые растворы добавлены различные концентрации сахарозы (10 – 200 мМ).

§2.2. Методика экспериментов для исследования поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточных альбуминов в растворах с ДСН и Тритоном X-100

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре Perkin Elmer LS55 при комнатной температуре. Триптофановая флуоресценция сывороточного альбумина человека и бычьего сывороточного альбумина в растворах детергентов регистрировалась в диапазоне 300–500 нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$.

Степень поляризации P триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека и бычьего сывороточного альбумина рассчитывалась по значениям I_{\parallel} и I_{\perp} в максимуме спектра испускания флуоресценции белка, где I_{\parallel} и I_{\perp} – интенсивности флуоресценции, измеренные через поляризатор, электрическая ось которого направлена параллельно или перпендикулярно поляризации возбуждающего света. Спектры флуоресценции обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

Глава 3. Исследование вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека при денатурации под действием ионного детергента ДСН при различных значениях рН (собственные результаты и их обсуждение)

В данной главе представлены результаты исследований механизма денатурации молекул сывороточного альбумина человека под действием различных концентраций ионного детергента ДСН при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа по изучению поляризованной белковой триптофановой флуоресценции. Единственный аминокислотный остаток триптофана Trp-214 в сывороточном альбумине человека, состоящем из трех доменов, расположен в домене II.

Проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН.

Получены (рис. 3.1) зависимости степени поляризации (P) триптофановой флуоресценции альбумина человека от концентрации ДСН для различных значений рН (в отсутствие сахарозы). Значения степени поляризации P рассчитывались по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектров испускания флуоресценции сывороточного альбумина человека.

Как известно, изменения поляризации флуоресценции обуславливаются двумя причинами – во-первых, вращательной диффузией флуорофоров и, во-вторых, безызлучательным переносом энергии между флуорофорами. Благодаря подбору экспериментальных условий (исследованы сильно разбавленные растворы белка (5 мкМ) и использовано возбуждение флуоресценции триптофана на дальнем длинноволновом крае (295 нм)) вклад от второй причины – безызлучательного переноса энергии между флуорофорами – отсутствует. На поляризацию флуоресценции триптофана альбумина человека оказывает влияние только вращательная диффузия флуорофора – триптофанового остатка молекулы белка.

Эта поляризация флуоресценции триптофанового остатка молекулы альбумина человека в общем случае обусловлена как вращением целой молекулы белка (броуновское движение), так и вращением домена II белка, содержащего триптофановый остаток, так и вращением самого триптофана относительно своего ближайшего окружения, связанным с дипольно – ориентационной релаксацией хромофора после возбуждения. Проведенные в данной работе стационарные измерения поляризованной флуоресценции сывороточного альбумина человека позволяют анализировать вращение целой молекулы белка, а вклад вращения домена, содержащего триптофан, и вращения триптофанового остатка относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым.

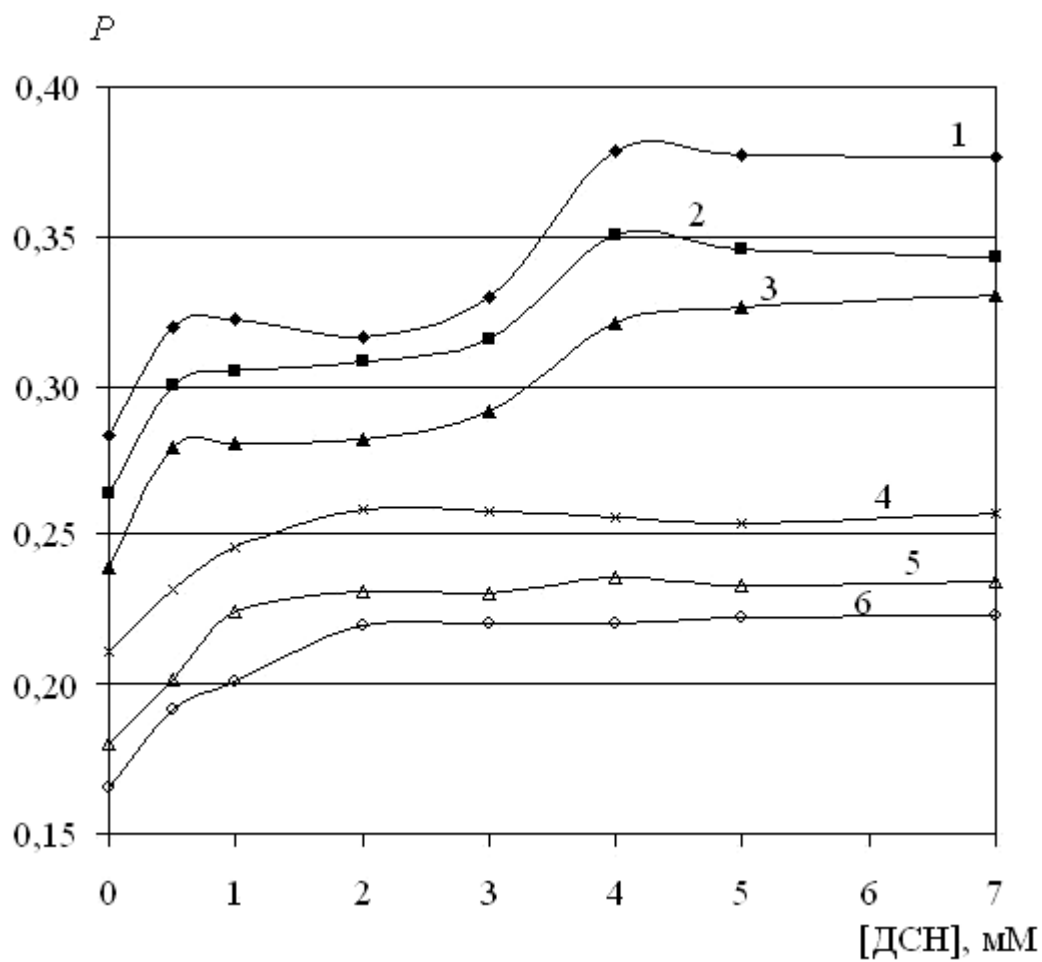


Рис. 3.1. Зависимость степени поляризации P триптофановой флуоресценции ($\lambda_{возб} = 295$ нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6).

Зависимости степени поляризации триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН (рис. 3.1) можно объяснить двустадийным механизмом денатурации этого белка в присутствии ДСН: первая переходная стадия денатурации белка – разрыхление белковых глобул, вторая стадия денатурации – разворачивание аминокислотной цепи белка.

Как видно из рис. 3.1, значения степени поляризации флуоресценции P возрастают в области до 1 мМ ДСН для всех рН, что указывает на первую стадию денатурации сывороточного альбумина человека – разрыхление глобул, что уменьшает вращательную диффузию молекул белка.

Дальнейшее увеличение (больше 1 мМ) концентрации ДСН при рН, больших изоэлектрической точки альбумина (рI 4,7), практически не меняет значений степени поляризации флуоресценции P , что указывает на то, что размеры молекул сывороточного альбумина человека не меняются и, следовательно, денатурация останавливается на первой стадии.

Иной характер зависимостей степени поляризации флуоресценции P от концентрации ДСН наблюдается (рис. 3.1) при рН, меньших рI белка: в области концентраций ДСН от 1 мМ до 2 мМ значение P практически постоянно, в области концентраций ДСН от 2 мМ до 4 мМ происходит дальнейшее увеличение P , что указывает на увеличение линейно-продольных размеров молекул сывороточного альбумина человека при разворачивании аминокислотной цепи и уменьшение их вращательной диффузии, что, в свою очередь, говорит о том, что молекулы альбумина переходят во вторую стадию денатурации – стадию полного разворачивания, а при увеличении концентрации ДСН свыше 4 мМ (до 7 мМ) значения P практически постоянны, что указывает на полную денатурацию молекул белка. По двустадийному увеличению значений степени поляризации флуоресценции P при увеличении концентрации ДСН можно заключить, что при рН, меньших рI альбумина, денатурация альбумина человека в присутствии ДСН представляет собой ступенчато – двустадийный процесс, в отличие от рН, больших рI белка, где денатурация проходит только одну первую стадию.

В ходе исследований получены спектры поляризованной флуоресценции (параллельной и перпендикулярной компонент) сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями ДСН (0,5 – 7,0 мМ) при различных значениях рН (3,5 – 6,0) при добавлении в них различных концентраций сахарозы (10 – 200 мМ). В качестве примеров на рис. 3.2 и рис. 3.3 представлены соответственно спектры параллельной и перпендикулярной компонент поляризованной флуоресценции

сывороточного альбумина человека в растворах с 0,5 мМ ДСН при рН 3,5 с добавлением различных концентраций сахарозы.

Крупным применением метода поляризованной флуоресценции является оценка времен вращательной релаксации белков и оценка коэффициентов вращательной диффузии белков.

Путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН (при известном τ_0 - для триптофана сывороточного альбумина человека это 2,8 нсек).

На рис. 3.4 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН. Видно, что более сильное уменьшение коэффициента вращательной диффузии происходит при значениях рН, меньших изоэлектрической точки белка (рI 4,7), что указывает на глубокую и сильную денатурацию белка.

На рис. 3.5 представлены зависимости времени вращательной релаксации, отражающей время разупорядочивания флуорофора вследствие тепловой диффузии, молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН. Зарегистрировано, что при всех значениях рН в растворах с ДСН время вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека существенно больше времени жизни флуорофора – триптофанового остатка в альбумине (2,8 нсек).

На рис. 3.6. представлены зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул альбумина от концентрации ДСН при различных значениях рН. Эффективный радиус молекул сывороточного альбумина человека, определенный таким образом в сферическом приближении (по уравнению Стокса – Эйнштейна), отражает не реальный геометрический размер молекул альбумина человека, которые при прохождении денатурации под действием ДСН приобретают все более вытянутую, не сферическую геометрическую форму, а показывает эффективный размер молекул альбумина человека, меняющийся под действием ДСН и удобный для оценки степени глубины денатурации белка под действием ДСН. Видно, что более сильное увеличение размеров молекул белка имеет место при значениях рН, меньших изоэлектрической точки альбумина (рI 4,7), что говорит о глубокой денатурации белка при этих значениях рН.

При рассмотрении зависимостей параметров вращательной диффузии альбумина от концентрации ДСН видно, что денатурация сывороточного альбумина человека под действием ДСН носит двустадийный характер.

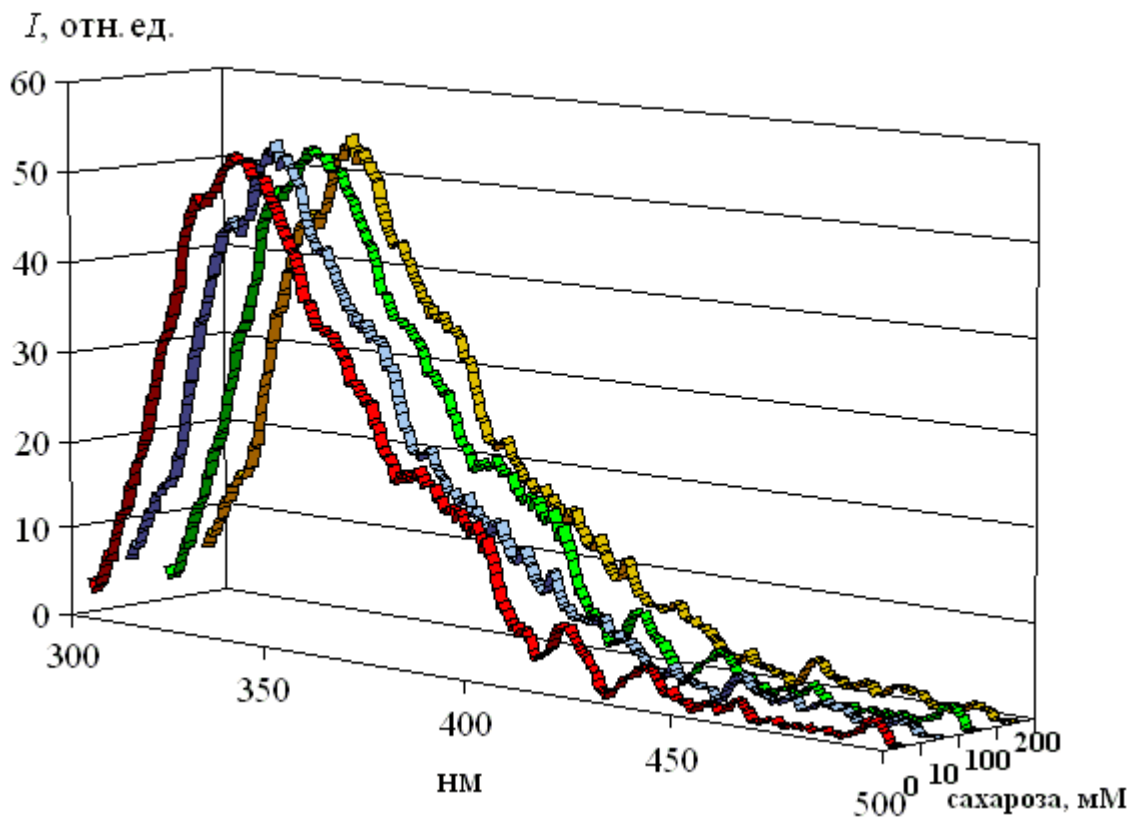


Рис. 3.2. Спектры поляризованной (параллельная компонента) флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с 0,5 мМ ДСН при рН 3,5 при добавлении различных концентраций сахарозы.

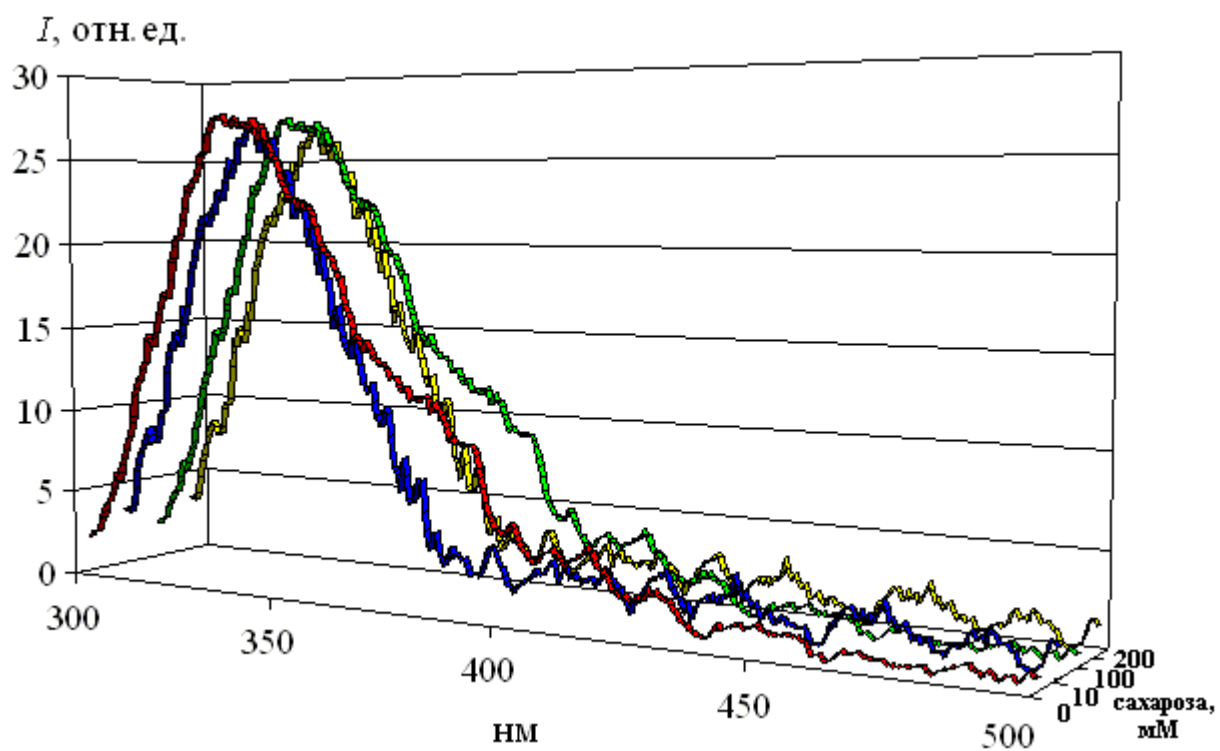


Рис. 3.3. Спектры поляризованной (перпендикулярная компонента) флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с 0,5 мМ ДСН при рН 3,5 при добавлении различных концентраций сахарозы.

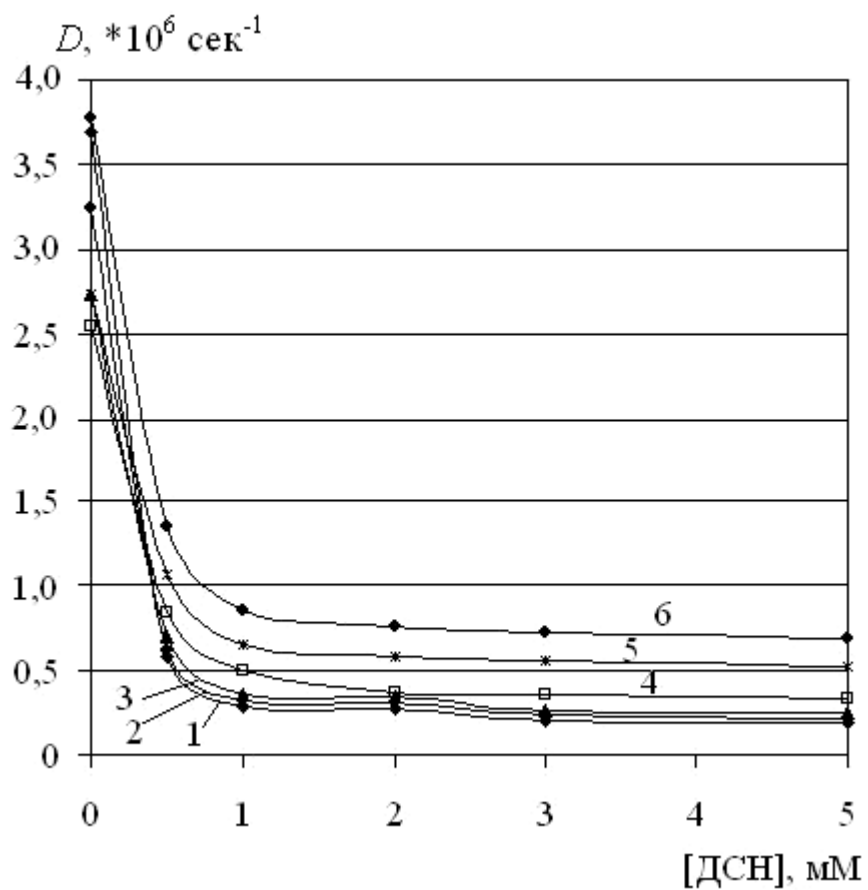


Рис. 3.4. Зависимости коэффициента вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6).

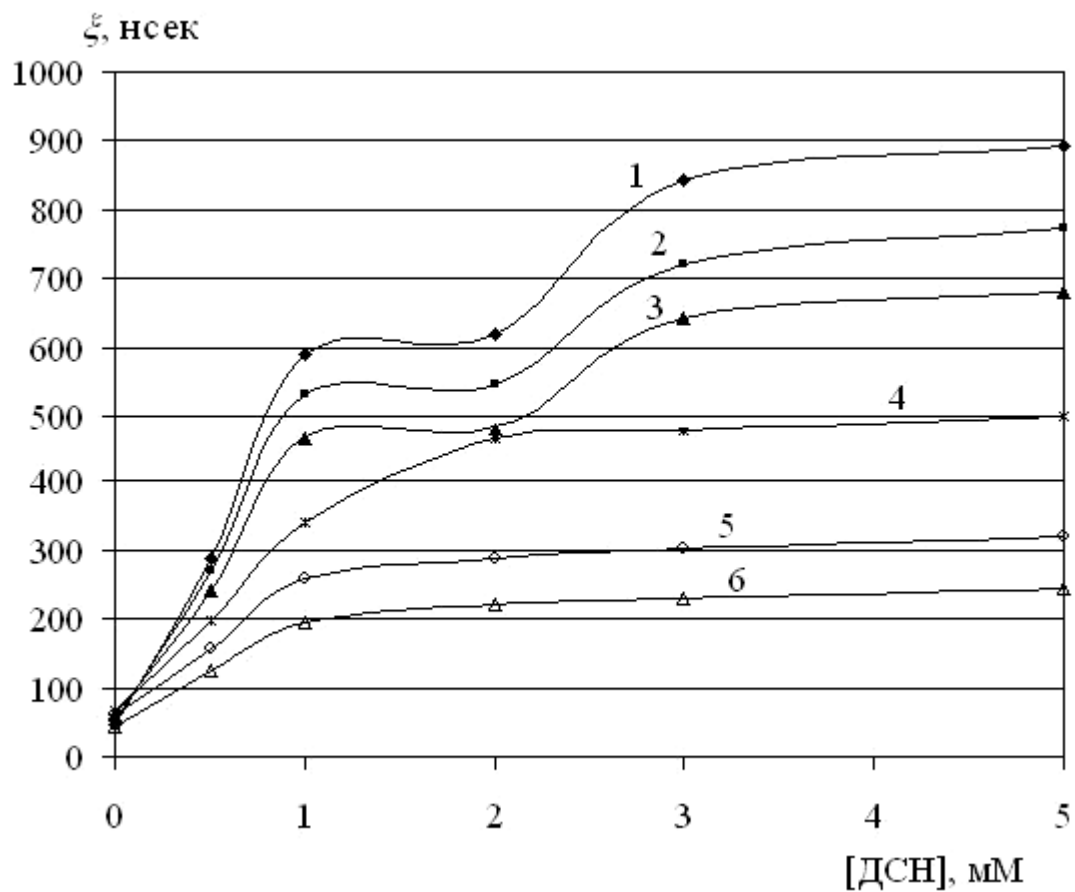


Рис. 3.5. Зависимости времени вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6).

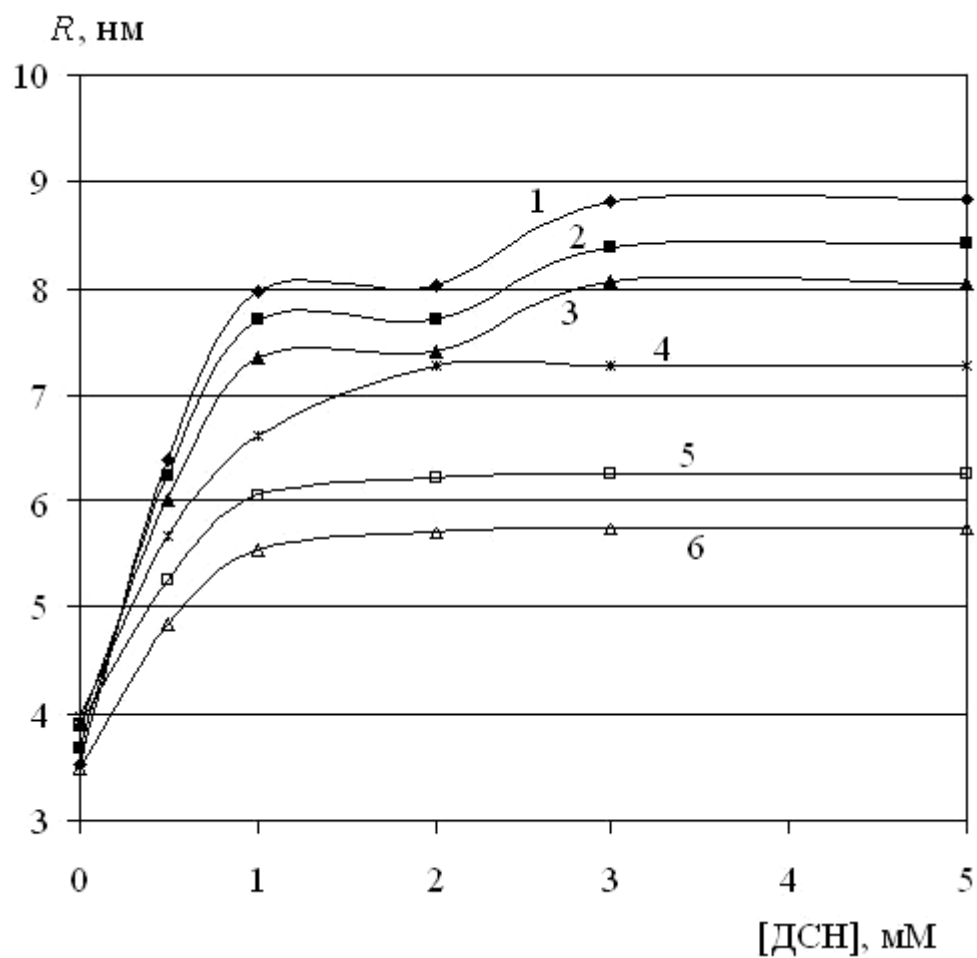


Рис. 3.6. Зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека от концентрации ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6).

При значениях рН, меньших рI (4,7), при концентрациях ДСН до 1 – 2 мМ происходит первая стадия денатурации – разрыхление глобул сывороточного альбумина человека, при концентрациях 3 – 4 мМ ДСН наступает вторая стадия – разворачивание аминокислотной цепи молекул альбумина, дальнейшее увеличение концентрации ДСН (больше, чем 4 мМ) ничего не меняет в системе.

При значениях рН, больших рI (4,7), при концентрациях ДСН до 1 – 2 мМ происходит первая стадия денатурации – разрыхление глобул сывороточного альбумина человека, дальнейшее увеличение концентрации ДСН (больше, чем 2 мМ) ничего не меняет в системе и денатурация останавливается на первой стадии.

Следовательно, более глубокая и сильная денатурация сывороточного альбумина человека под действием ДСН имеет место при значениях рН, меньших изоэлектрической точки белка (рI 4,7), что объясняется электростатическими причинами.

При значениях рН, меньших рI белка, в целом положительно заряженные молекулы альбумина легко связываются с додецилсульфат-анионами (ДСН в растворах диссоциирует на додецилсульфат-анионы и катионы натрия), что и объясняет более сильную денатурацию при этих значениях рН.

При значениях рН, больших рI белка, додецилсульфат-анионы слабо взаимодействуют с в-целом отрицательно заряженными молекулами белка, хотя и сохраняющими на себе какие-то положительно заряженные участки, поэтому денатурация белка при этих значениях рН под действием ДСН происходит слабее.

Глава 4. Исследование вращательной диффузии молекул сывороточных альбуминов при солюбилизации под действием нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях рН (собственные результаты и их обсуждение)

§4.1. Определение параметров вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях рН

В данном параграфе представлены результаты исследований солюбилизации молекул сывороточного альбумина человека в растворах нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа по изучению поляризованной белковой триптофановой флуоресценции. Единственный аминокислотный остаток триптофана Trp-214 в сывороточном альбумине человека, состоящем из трех доменов, расположен в домене II.

Триптофановая флуоресценция сывороточного альбумина человека возбуждалась светом с длиной волны $\lambda = 295$ нм, чтобы не затронуть поглощение Тритона X-100 в области 280 нм.

Проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 при различных значениях рН.

Получены (рис. 4.1) зависимости степени поляризации (P) триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека от концентрации Тритона X-100 для различных значений рН (в отсутствие сахарозы). Значения степени поляризации P рассчитывались по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектров испускания флуоресценции альбумина человека.

Изменения поляризации флуоресценции обуславливаются вращательной диффузией флуорофоров и безызлучательным переносом энергии между флуорофорами. Благодаря подбору экспериментальных условий на поляризацию флуоресценции триптофана альбумина человека оказывает влияние только вращательная диффузия триптофанового остатка молекулы белка. Как указывалось ранее, эта поляризация флуоресценции триптофанового остатка молекулы альбумина в общем случае обусловлена как вращением целой молекулы белка, так и вращением домена II белка, содержащего триптофановый остаток, так и вращением самого триптофана относительно своего ближайшего окружения. Проведенные в данной работе стационарные измерения поляризованной флуоресценции альбумина позволяют анализировать вращение целой молекулы белка, а вклад вращения домена, содержащего

триптофан, и вращения триптофанового остатка относительно ближайшего окружения считается пренебрежимо малым.

Видно (рис. 4.1), что в растворах с Тритоном X-100 значения степени поляризации триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека возрастают по сравнению с растворами без детергента.

В ходе исследований получены спектры поляризованной флуоресценции (параллельной и перпендикулярной компонент) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 (0,1 – 0,7 мМ) при различных значениях рН (3,5 – 8,0) при добавлении в них различных концентраций сахарозы (10 – 200 мМ). В качестве примеров на рис. 4.2 и рис. 4.3 представлены соответственно спектры параллельной и перпендикулярной компонент поляризованной флуоресценции альбумина человека в растворах с 0,5 мМ Тритоном X-100 при рН 5,0 с добавлением различных концентраций сахарозы.

Путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 при различных значениях рН (при известном τ_0 - для триптофана сывороточного альбумина человека это 2,8 нсек).

На рис. 4.4 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии сывороточного альбумина человека от концентрации Тритона X-100 в растворах с различными значениями рН. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 происходит уменьшение коэффициента вращательной диффузии сывороточного альбумина человека при всех значениях рН. Причем первое незначительное уменьшение коэффициента вращательной диффузии альбумина происходит при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100, а второе уже значительное уменьшение этого коэффициента происходит при 0,3 мМ Тритона X-100. Дальнейшее увеличение концентрации Тритона X-100 (больше 0,3 мМ и до 0,7 мМ) практически не влияет на коэффициент вращательной диффузии сывороточного альбумина.

Данный факт связан с тем, что критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) Тритона X-100 равна 0,25 мМ. Таким образом, в области концентраций 0,1 – 0,2 мМ Тритон X-100 находится еще в молекулярной фазе, и молекулы Тритона X-100 взаимодействуют с альбумином человека. Тогда как при 0,3 мМ Тритона X-100 (и больших концентрациях) детергент находится в мицеллярной фазе, и мицеллы Тритона X-100 взаимодействуют с альбумином человека.

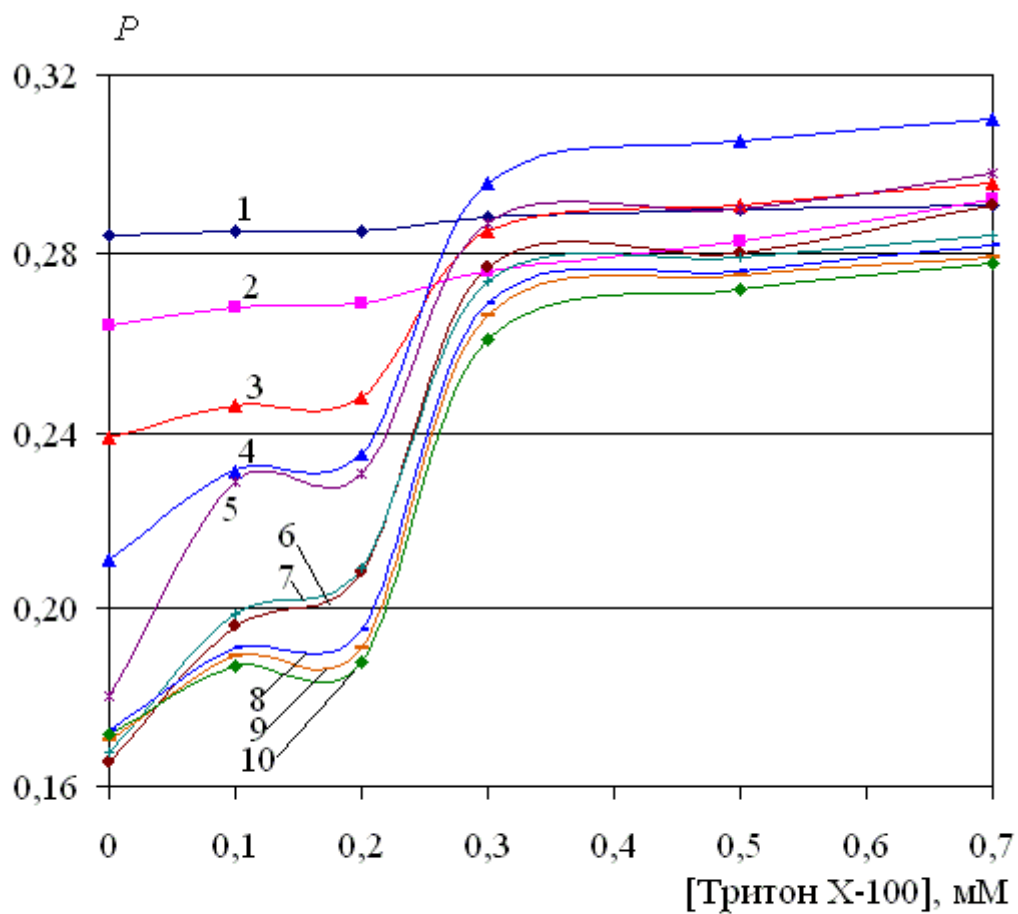


Рис. 4.1. Зависимость степени поляризации P триптофановой флуоресценции ($\lambda_{возб} = 295$ нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) от концентрации Тритона X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

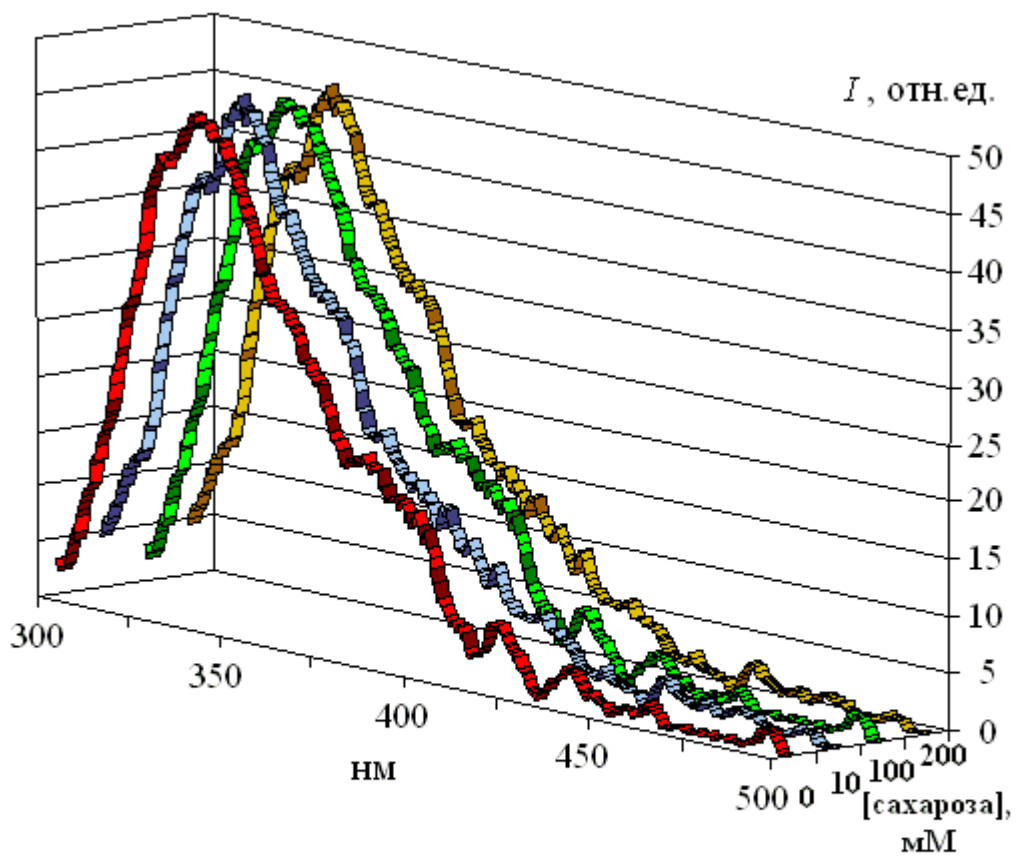


Рис. 4.2. Спектры поляризованной (параллельная компонента) триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с 0,5 мМ Тритона X-100 при рН 5,0 при добавлении различных концентраций сахарозы.

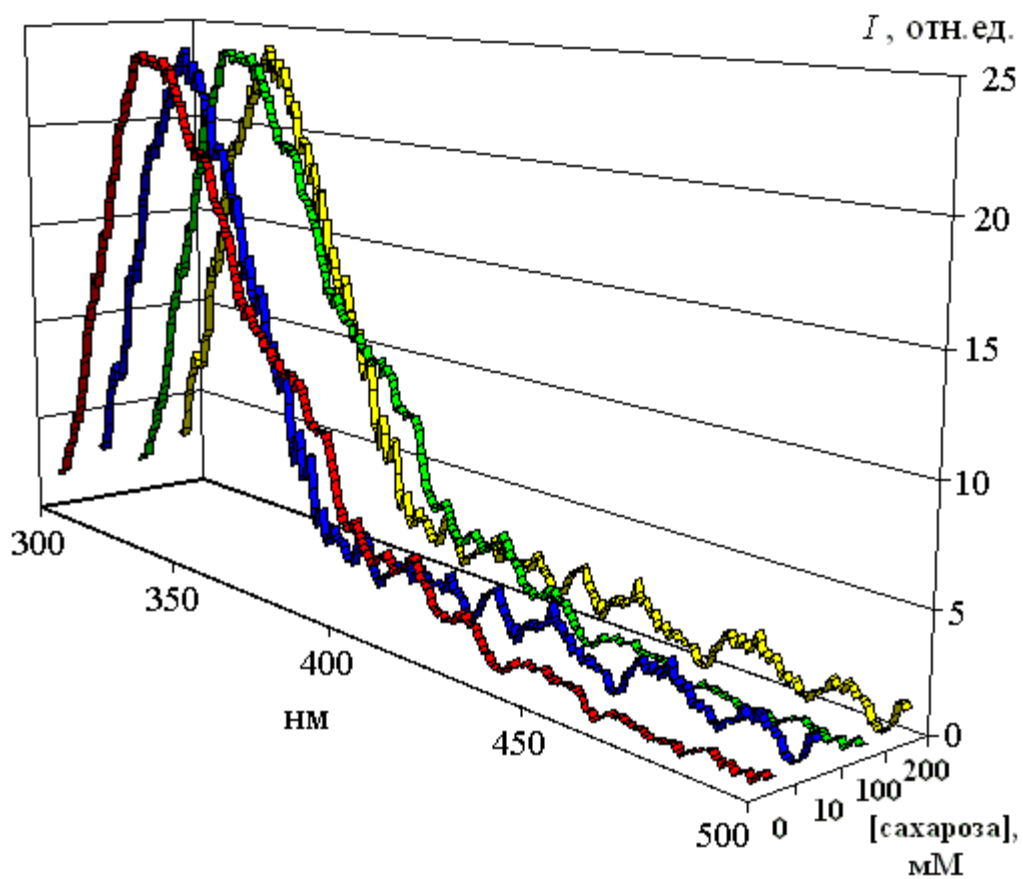


Рис. 4.3. Спектры поляризованной (перпендикулярная компонента) триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с 0,5 мМ Тритон Х-100 при рН 5,0 при добавлении различных концентраций сахарозы.

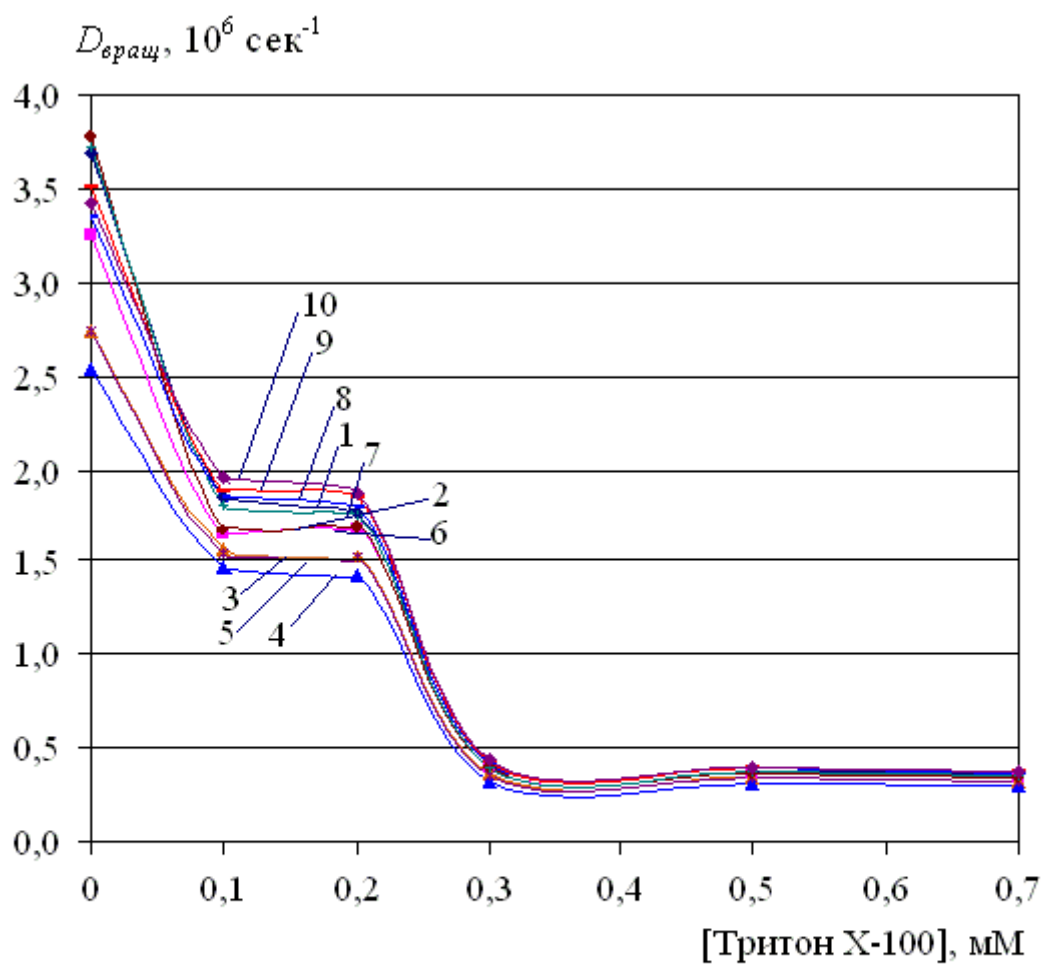


Рис. 4.4. Зависимости коэффициента вращательной диффузии молекул сывороточного альбумина человека от концентрации Тритон X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

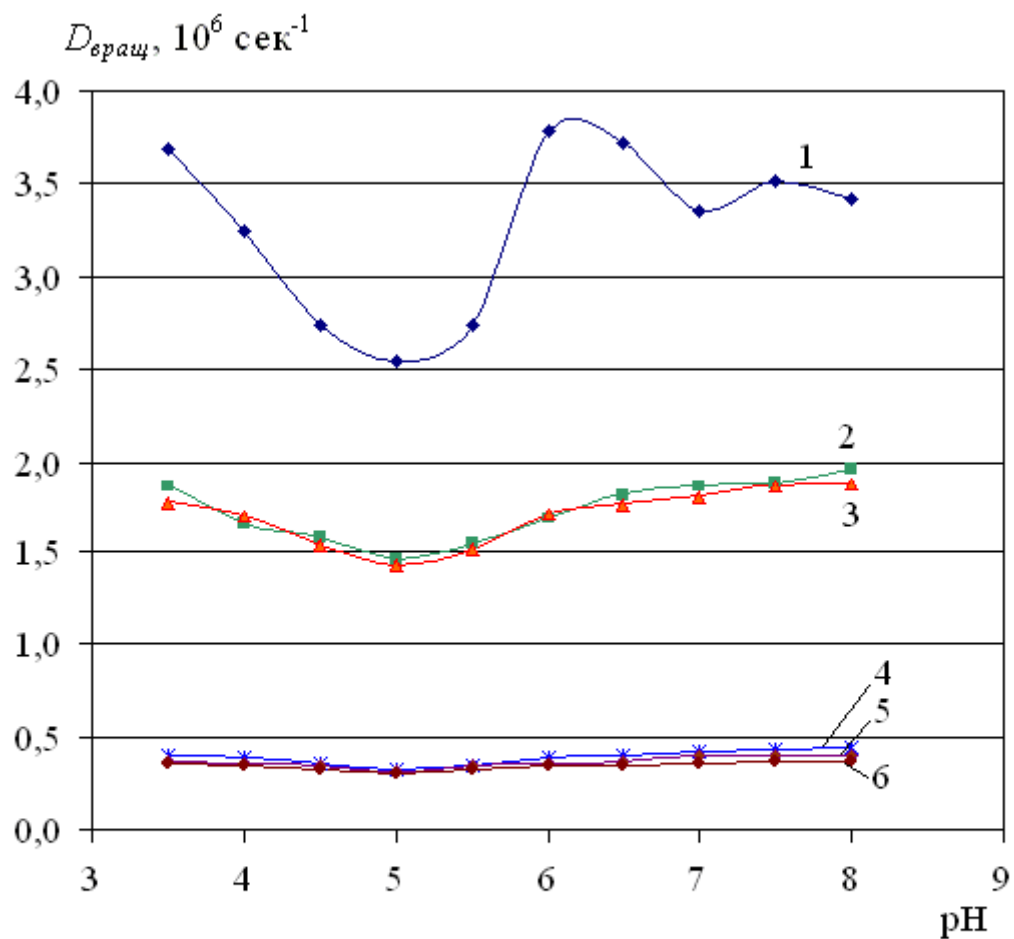


Рис. 4.5. Зависимость от рН коэффициента вращательной диффузии сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями Тритона X-100: 0 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,2 мМ (3), 0,3 мМ (4), 0,5 мМ (5), 0,7 мМ (6).

Связывание молекулами белка небольших молекул детергента (в области 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) приводит к незначительному уменьшению коэффициента вращательной диффузии альбумина. Тогда как связывание молекул белка с крупными (агрегационное число = 140) мицеллами детергента (в области 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) приводит к значительному уменьшению коэффициента вращательной диффузии альбумина.

На рис. 4.5 представлена зависимость коэффициента вращательной диффузии сывороточного альбумина человека от pH растворов, содержащих различные концентрации Тритона X-100. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 коэффициент вращательной диффузии белка нелинейно зависит от pH с минимумом при pH 5,0, что указывает на наилучшее связывание молекул (при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) или мицелл (при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) детергента с белком при этом значении pH. Данный факт объясняется тем, что при pH 5,0, лежащем вблизи изоэлектрической точки альбумина человека (4,7), молекулы альбумина в целом электрически нейтральны и поэтому с ними наиболее интенсивно связываются нейтральные молекулы или мицеллы Тритона X-100.

На рис. 4.6 представлены зависимости времени вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека от концентрации Тритона X-100 в растворах с различными значениями pH. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 происходит увеличение времени вращательной релаксации альбумина человека по сравнению с растворами без детергента: незначительное увеличение – при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100 и существенное увеличение – при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100.

На рис. 4.7 представлены зависимости времени вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека от pH в растворах с различными концентрациями Тритона X-100. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 время вращательной релаксации альбумина нелинейно зависит от pH с максимумом при pH 5,0, что указывает на наилучшее связывание молекул (0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) или мицелл (0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) детергента с белком при этом значении pH.

На рис. 4.8 представлены зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека от концентрации Тритона X-100 при различных значениях pH. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 происходит увеличение эффективного размера молекул альбумина человека по сравнению с растворами без детергента: незначительное увеличение – при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100 и существенное увеличение – при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100.

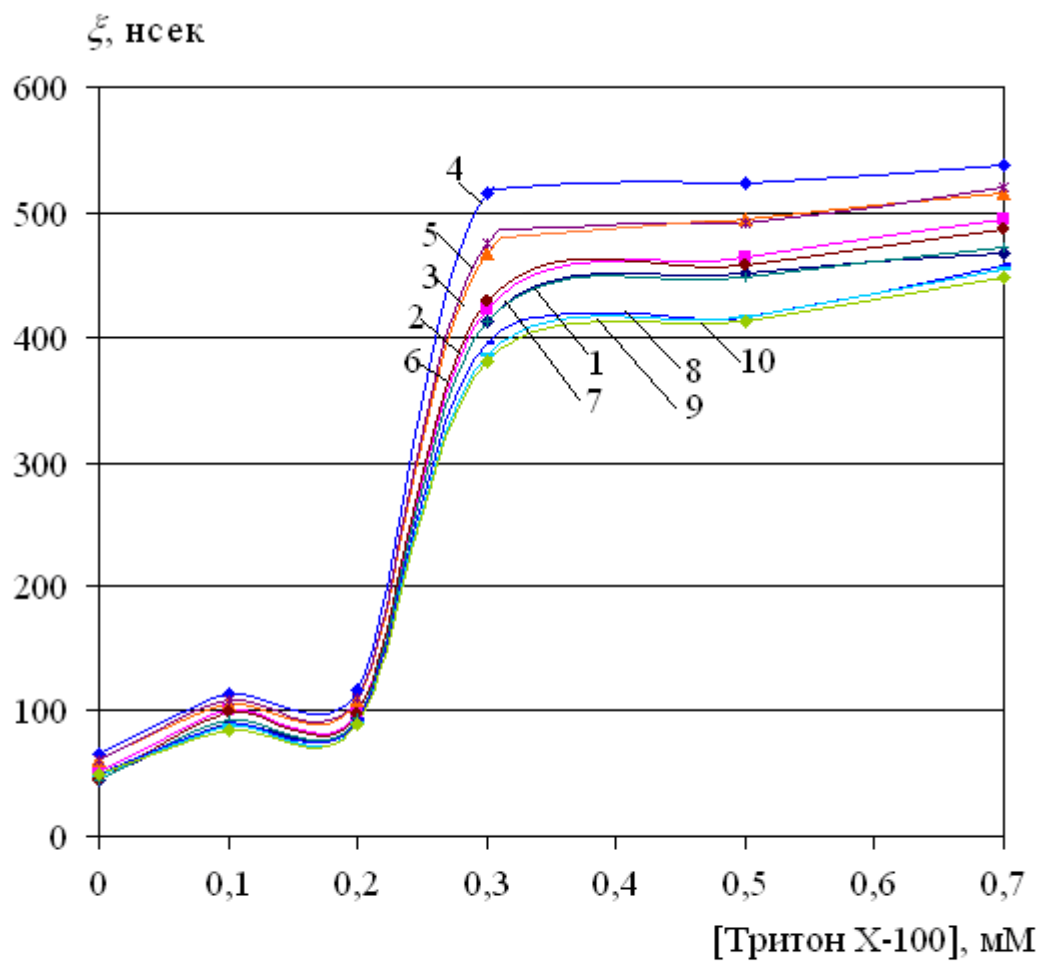


Рис. 4.6. Зависимости времени вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека от концентрации Тритона X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

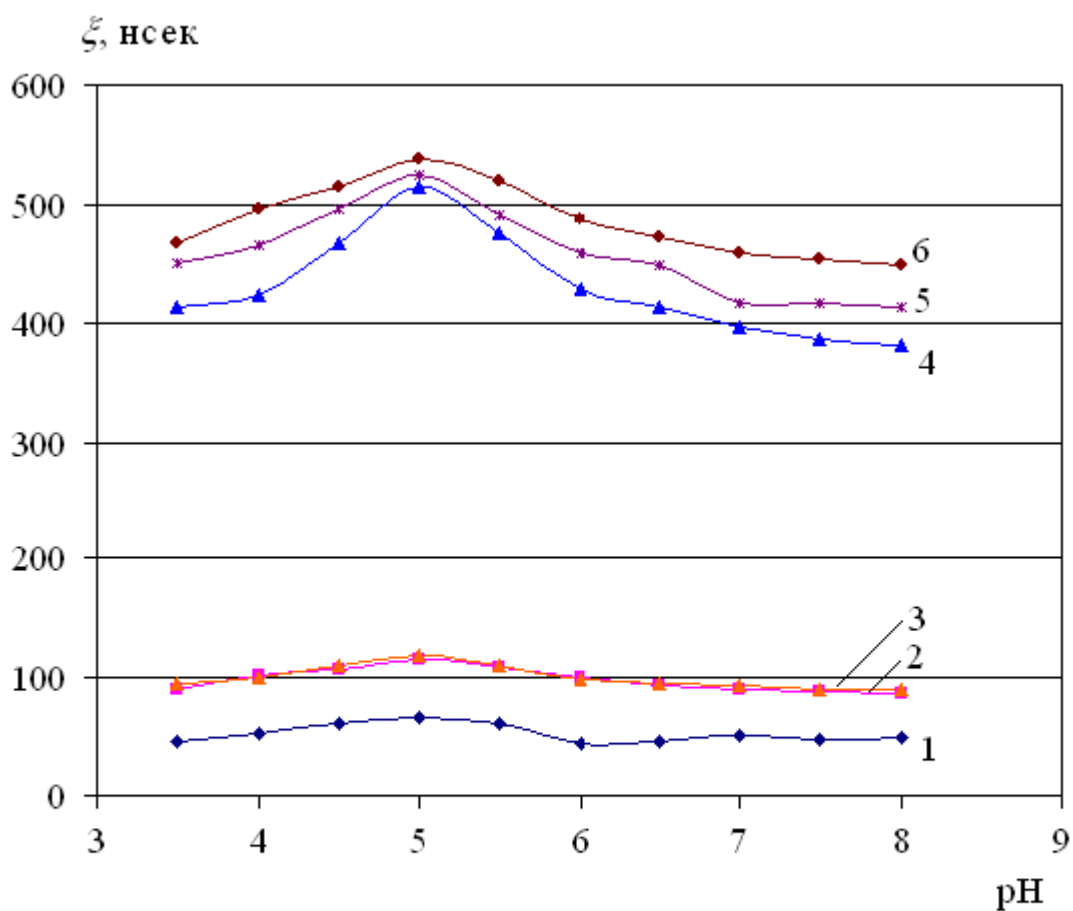


Рис. 4.7. Зависимость от рН времени вращательной релаксации молекул сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями Тритона X-100: 0 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,2 мМ (3), 0,3 мМ (4), 0,5 мМ (5), 0,7 мМ (6).

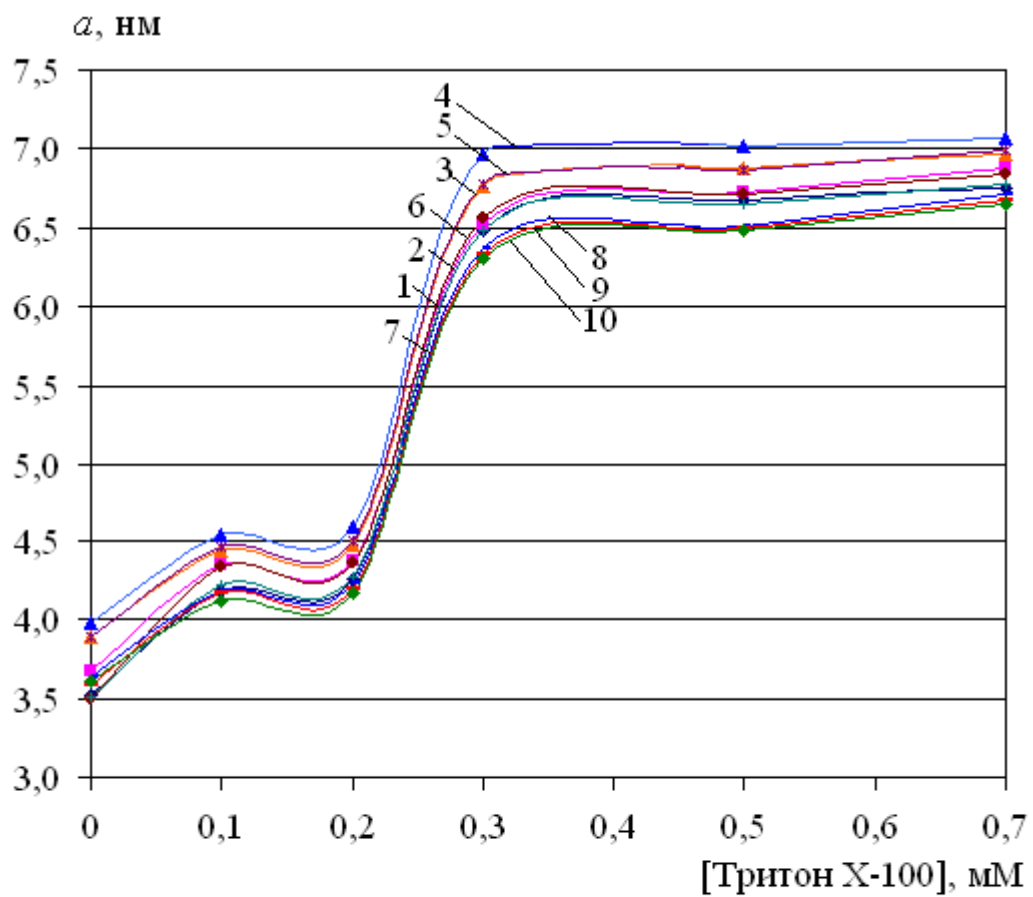


Рис. 4.8. Зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека от концентрации Тритон X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

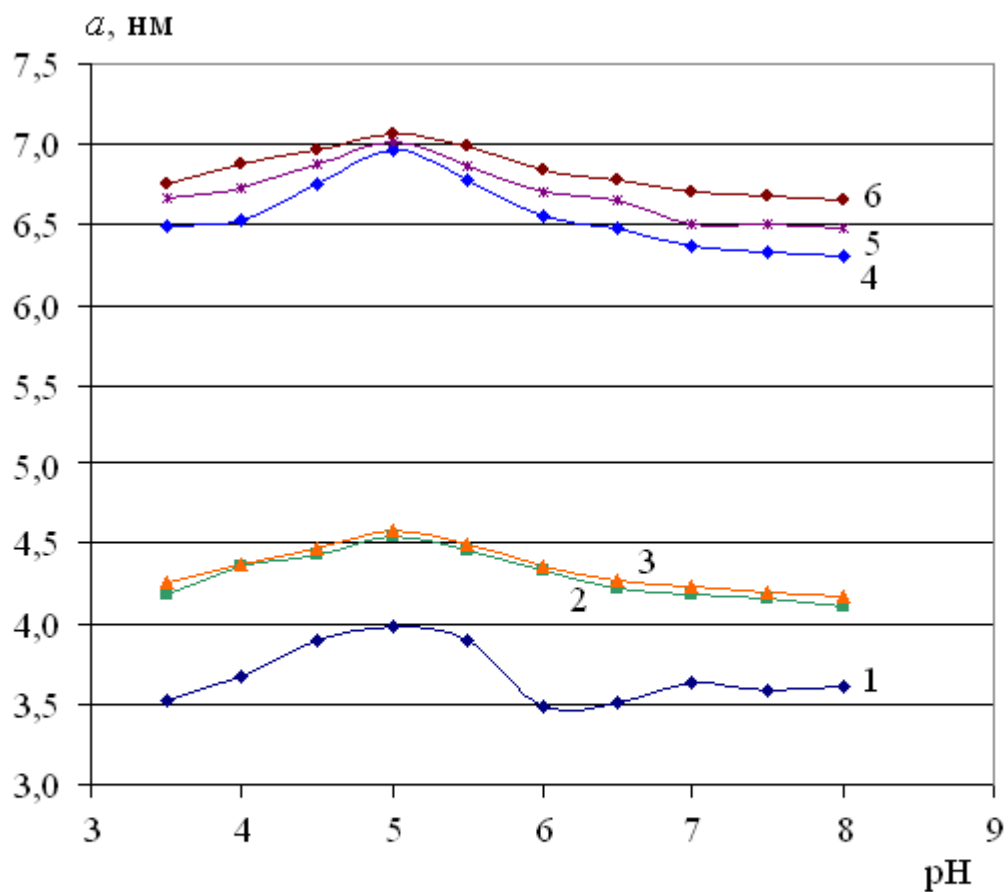


Рис. 4.9. Зависимость от pH радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями Тритона X-100: 0 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,2 мМ (3), 0,3 мМ (4), 0,5 мМ (5), 0,7 мМ (6).

В области концентраций 0,1 – 0,2 мМ Тритон X-100 находится в молекулярной фазе, и молекулы Тритона X-100 взаимодействуют с альбумином человека, что приводит к небольшому увеличению эффективного радиуса Эйнштейна молекул альбумина.

При концентрациях 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100 детергент находится в мицеллярной фазе, и мицеллы Тритона X-100 взаимодействуют с альбумином человека (солюбилизируют его), что приводит к сильному увеличению радиуса Эйнштейна молекул альбумина. Мицеллы Тритона X-100 солюбилизируют молекулы альбумина человека, степень солюбилизации белка увеличивается с увеличением содержания детергента вплоть до выхода на плато при концентрации Тритона X-100, большей 0,3 – 0,5 мМ.

При солюбилизации происходит встраивание молекул белка в мицеллы Тритона X-100. Основная проблема в вопросах солюбилизации белков – это подбор оптимальных условий солюбилизации исследуемого белка. Ионные детергенты, денатурирующие белки (например, ДСН), не подходят для решения такой деликатной задачи. Для солюбилизации нужен такой детергент, который не нарушал бы вторичную и третичную структуры белка, а лишь связывался с гидрофобными участками белковой молекулы.

Для солюбилизации белков необходимо учитывать заряд детергента (лучше нейтральный детергент), его ККМ (критическую концентрацию мицеллообразования) и размер мицелл детергента (мицеллы Тритона X-100 при комнатной температуре имеют диаметр 7 – 9 нм).

Эмпирически показано, что для солюбилизации белков эффективным детергентом является нейтральный детергент Тритон X-100 (ККМ 0,25 мМ). Из полученных результатов видно, что при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100 его мицеллы эффективно солюбилизируют молекулы альбумина человека.

На рис. 4.9 представлены зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул сывороточного альбумина человека от рН растворов с различными концентрациями Тритона X-100. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 эффективный радиус Эйнштейна молекул альбумина нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее связывание нейтральных молекул (при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) или нейтральных мицелл (при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) детергента с белком при этом значении рН, так как молекулы белка при этом значении рН (вблизи изоэлектрической точки белка) в целом электрически нейтральны. Таким образом, наиболее эффективная солюбилизация молекул сывороточного альбумина с помощью нейтрального детергента Тритона X-100 (0,3 – 0,7 мМ) происходит при рН 5,0.

§4.2. Определение параметров вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях рН

В данном параграфе представлены результаты исследований солюбилизации молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах нейтрального детергента Тритона X-100 при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа по изучению поляризованной белковой триптофановой флуоресценции.

Бычий сывороточный альбумин – глобулярный белок семейства альбуминов, его изоэлектрическая точка pI 4,9, молекулярная масса 64 кДа. Первичная структура бычьего сывороточного альбумина определяется 582 аминокислотными остатками. Вторичная структура бычьего сывороточного альбумина в зависимости от рН состоит из 50 – 68 % α -спиралей, 3 % β -складчатых слоев и 29 – 47 % участков хаотической укладки. Третичная структура этого белка определяется тремя доменами, каждый из которых состоит из двух субдоменов.

Таким образом, бычий сывороточный альбумин представляет собой типичный белок семейства альбуминов, схожий по своему строению с сывороточным альбумином человека. Но бычий сывороточный альбумин имеет и отличия от сывороточного альбумина человека. В частности, в отличие от альбумина человека, имеющего один остаток триптофана (Трп 214), бычий сывороточный альбумин имеет в своей аминокислотной цепи два остатка триптофана – Трп 135 и Трп 214.

Время затухания флуоресценции триптофана альбумина человека равно 2,8 нсек. Бычий сывороточный альбумин содержит два триптофана, каждый из которых имеет свое время затухания флуоресценции (Трп 214 – 4,4 нсек, Трп 135 – 6,7 нсек), тогда как время затухания флуоресценции в целом бычьего сывороточного альбумина – это 3,9 нсек. Данное время (3,9 нсек) учитывалось в расчетах в этой работе.

Триптофановая флуоресценция бычьего сывороточного альбумина возбуждалась светом с длиной волны $\lambda = 295$ нм, чтобы не затронуть поглощение Тритона X-100 в области 280 нм.

Проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 при различных значениях рН.

Получены (рис. 4.10) зависимости степени поляризации (P) триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина от концентрации Тритона X-100 для различных значений рН (в отсутствие сахарозы). Значения степени поляризации P

рассчитывались по значениям $I_{||}$ и I_{\perp} в максимуме спектров испускания флуоресценции бычьего альбумина.

Изменения поляризации флуоресценции обуславливаются вращательной диффузией флуорофоров и безызлучательным переносом энергии между флуорофорами. Благодаря подбору экспериментальных условий на поляризацию флуоресценции бычьего сывороточного альбумина оказывает влияние только вращательная диффузия флуорофоров – триптофановых остатков молекулы белка.

Эта поляризация флуоресценции триптофановых остатков молекулы бычьего альбумина обусловлена как вращением целой молекулы белка, так и вращением доменов белка, содержащих триптофановые остатки, так и вращением самих триптофанов. Проведенные в данной работе стационарные измерения поляризованной флуоресценции бычьего альбумина позволяют анализировать только вращение целой молекулы белка.

Видно (рис. 4.10), что в растворах с Тритоном X-100 значения степени поляризации триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина возрастают по сравнению с растворами без детергента. Наиболее сильный рост значений степени поляризации триптофановой флуоресценции бычьего альбумина происходит при концентрациях Тритона X-100, больших 0,3 мМ, что аналогично изменению поляризации триптофановой флуоресценции альбумина человека в растворах с Тритоном X-100.

В ходе исследований получены спектры поляризованной флуоресценции (бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 (0,1 – 0,7 мМ) при различных значениях pH (3,5 – 8,0) при добавлении в них различных концентраций сахарозы (10 – 200 мМ). В качестве примеров на рис. 4.11 и рис. 4.12 представлены соответственно спектры параллельной и перпендикулярной компонент поляризованной флуоресценции бычьего альбумина в растворах с 0,3 мМ Тритоном X-100 при pH 5,0 с добавлением различных концентраций сахарозы.

Путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул бычьего альбумина в растворах с различными концентрациями Тритона X-100 при различных значениях pH (при известном τ_0 - для бычьего сывороточного альбумина это 3,9 нсек). На рис. 4.13 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии бычьего альбумина от концентрации Тритона X-100 в растворах с различными значениями pH. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 происходит уменьшение коэффициента вращательной диффузии бычьего альбумина при всех значениях pH, как и в случае коэффициента вращательной диффузии альбумина человека в растворах Тритона X-100.

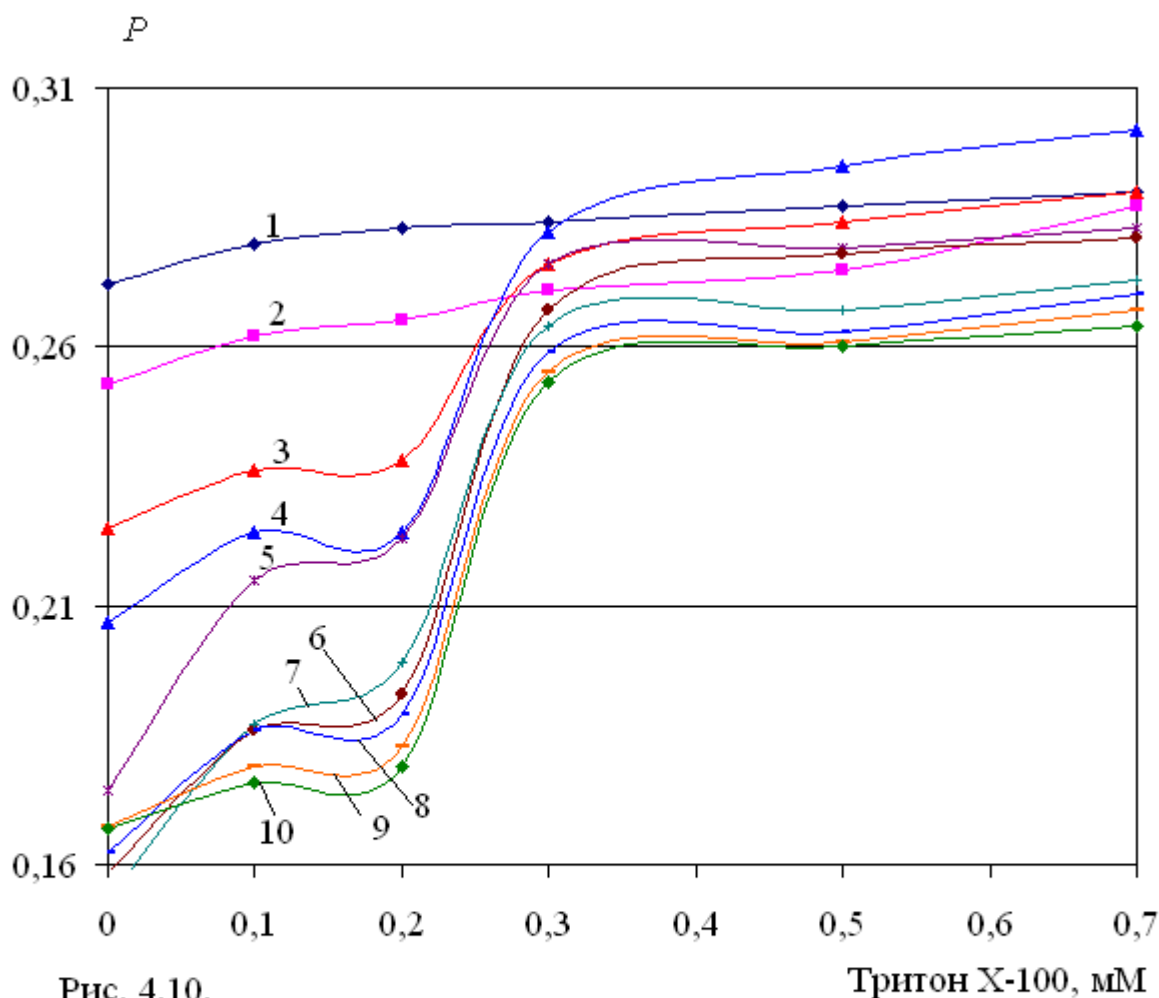


Рис. 4.10.

Зависимость степени поляризации триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) от концентрации Тритона X-100 при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

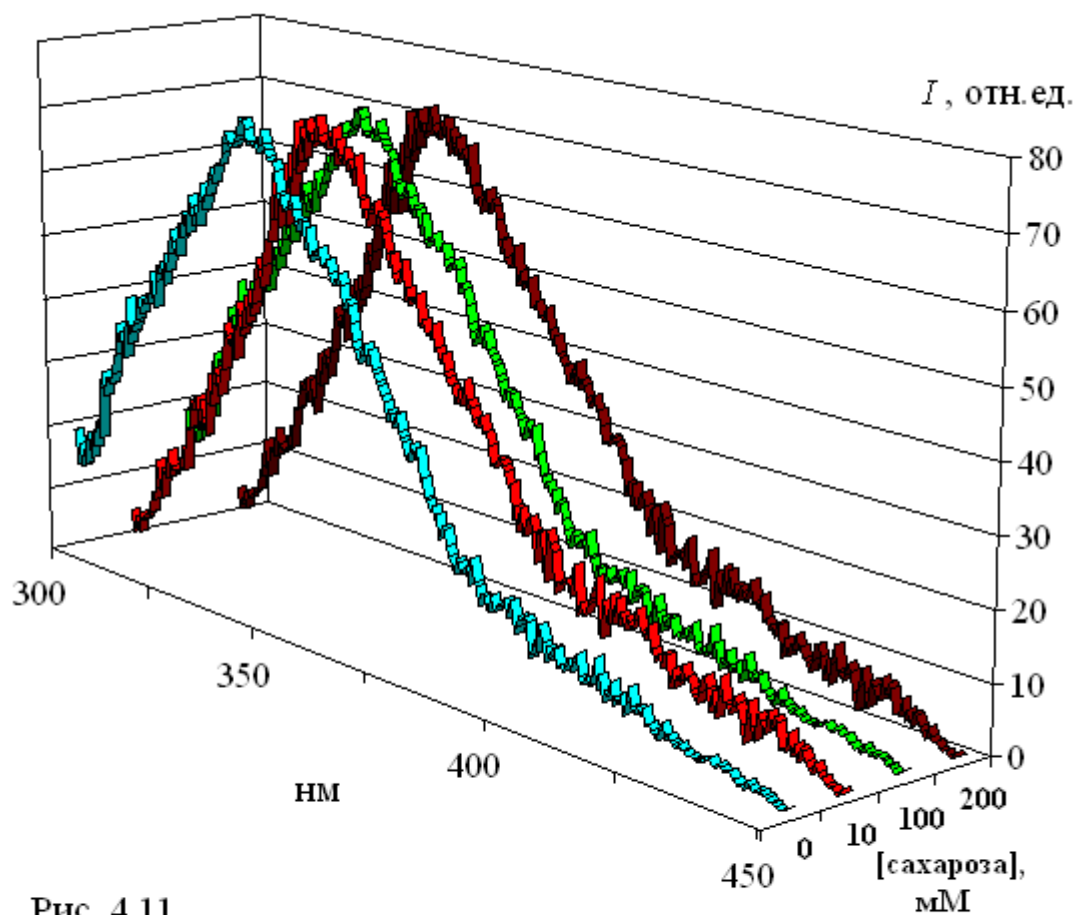


Рис. 4.11
 Спектры поляризованной (параллельная компонента) триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с 0,3 мМ Тритона X-100 при рН 5,0 с различными концентрациями сахарозы.

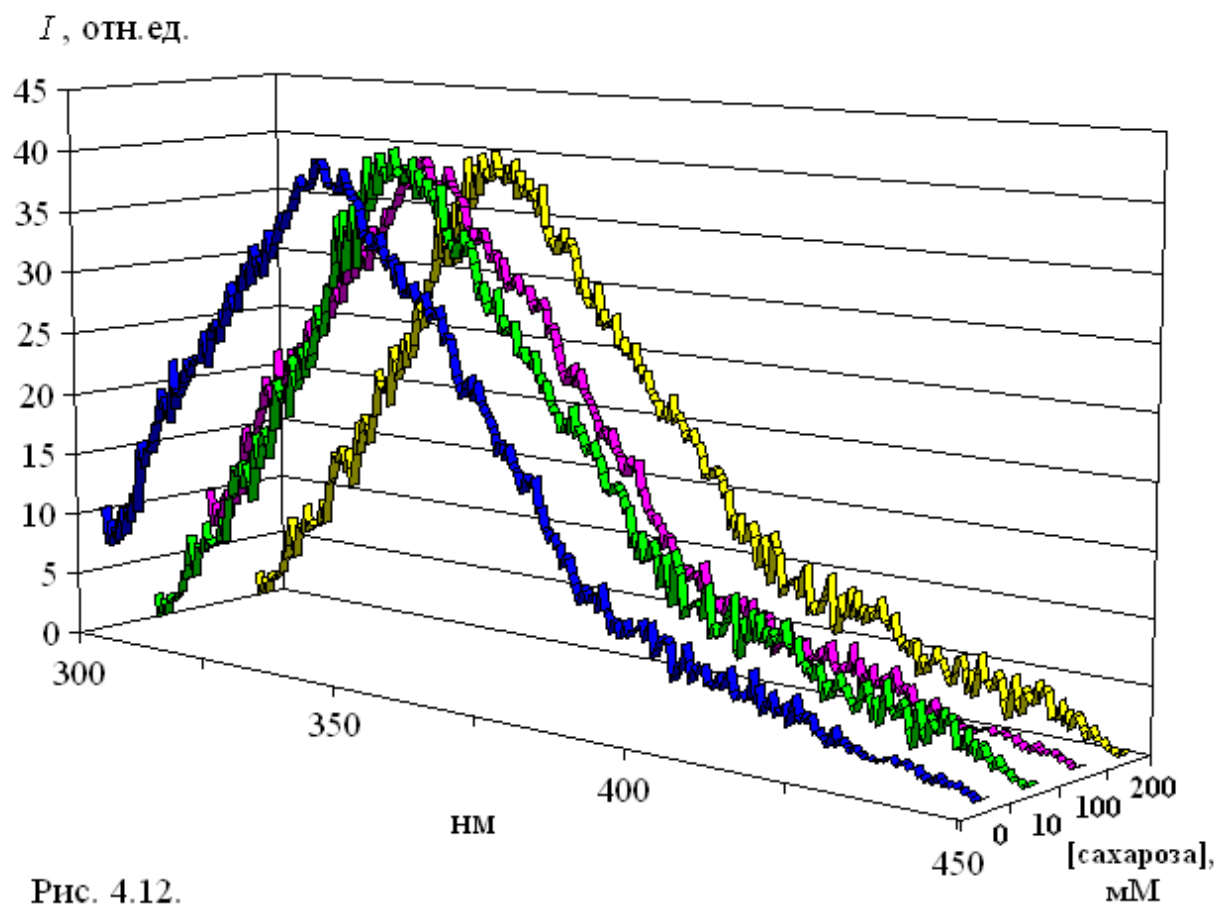


Рис. 4.12.

Спектры поляризованной (перпендикулярная компонента) триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с 0,3 мМ Тритона X-100 при pH 5,0 с различными концентрациями сахарозы.

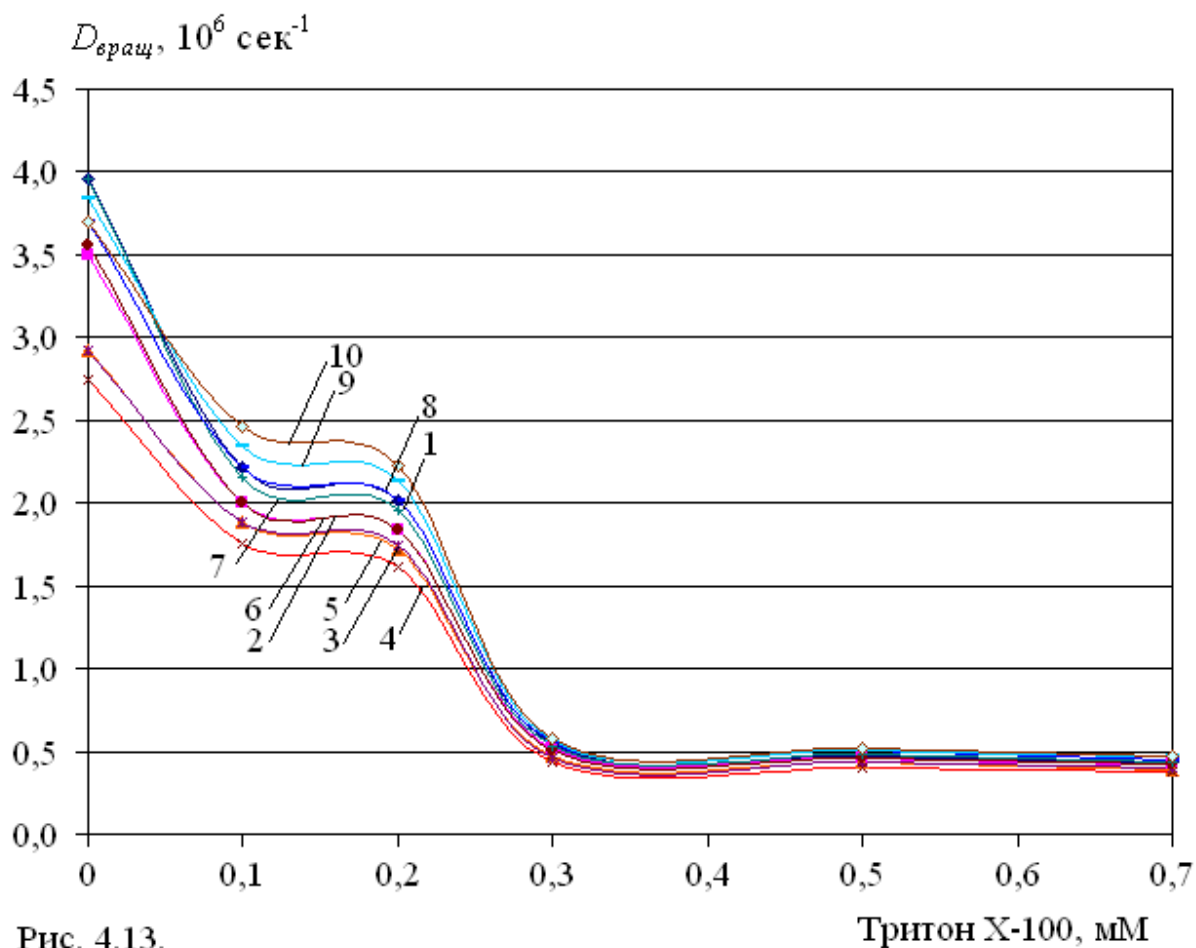


Рис. 4.13. Зависимости коэффициента вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации Тритона X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

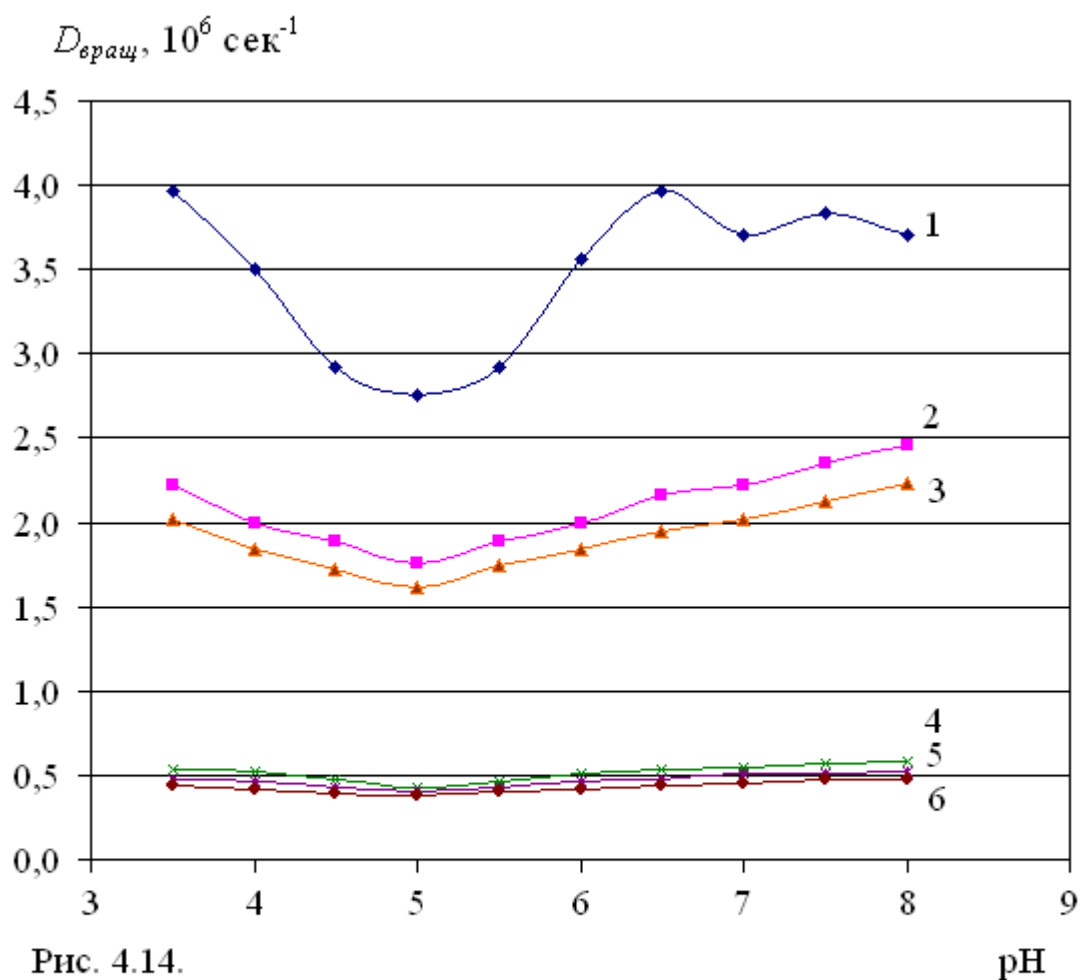


Рис. 4.14.

Зависимость от pH коэффициента вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями Тритона X-100: 0 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,2 мМ (3), 0,3 мМ (4), 0,5 мМ (5), 0,7 мМ (6).

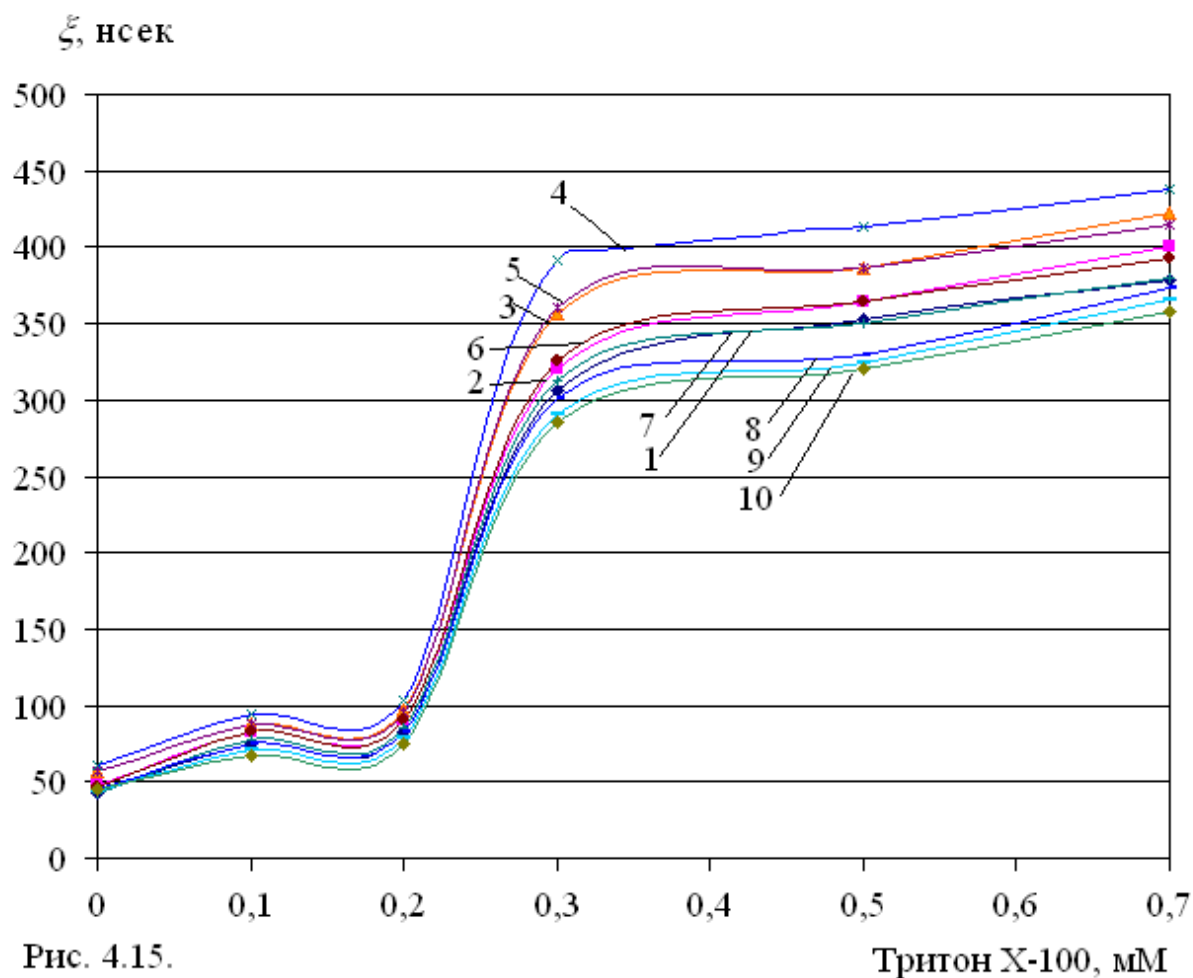


Рис. 4.15.

Тритон X-100, мМ

Зависимость времени вращательной релаксации молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации Тритона X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

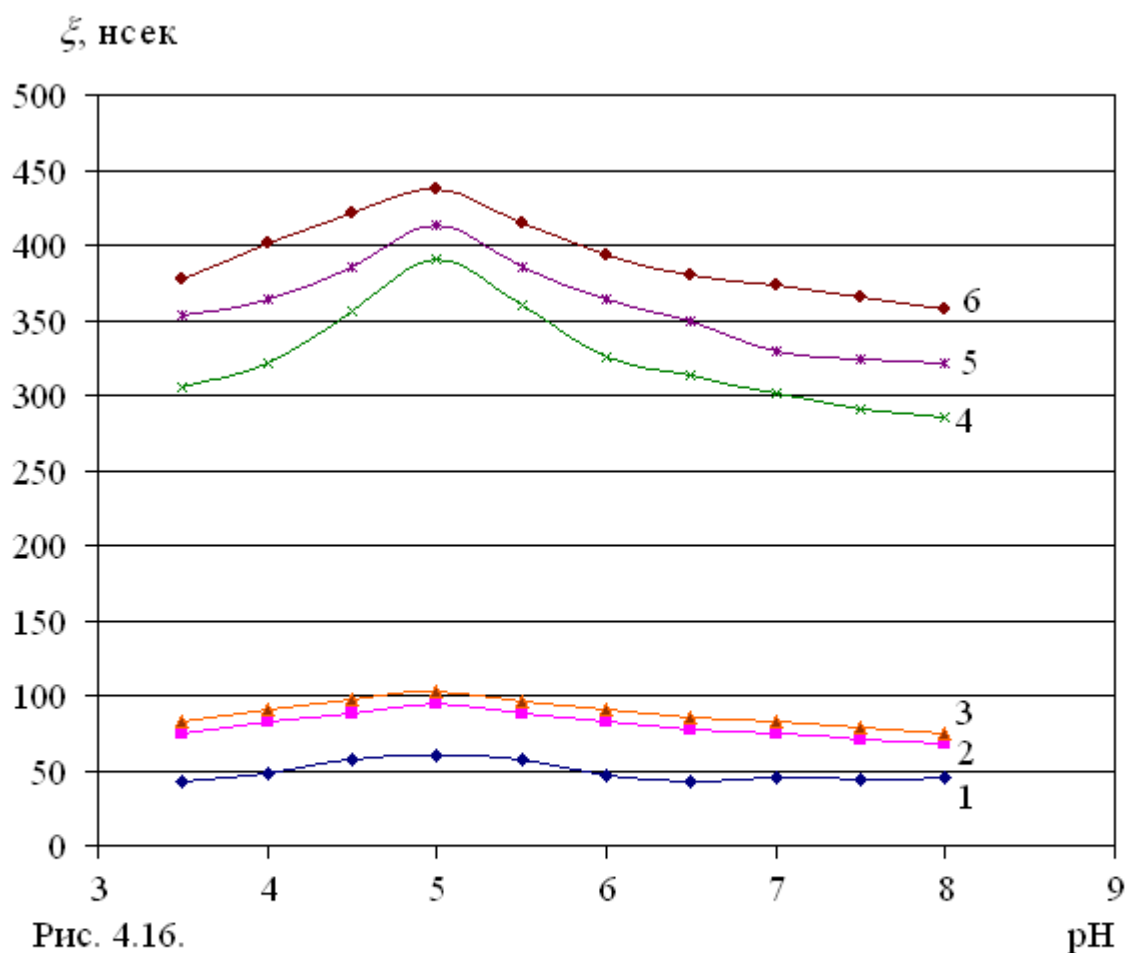


Рис. 4.16.

Зависимость от рН времени вращательной релаксации молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями Тритона X-100: 0 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,2 мМ (3), 0,3 мМ (4), 0,5 мМ (5), 0,7 мМ (6).

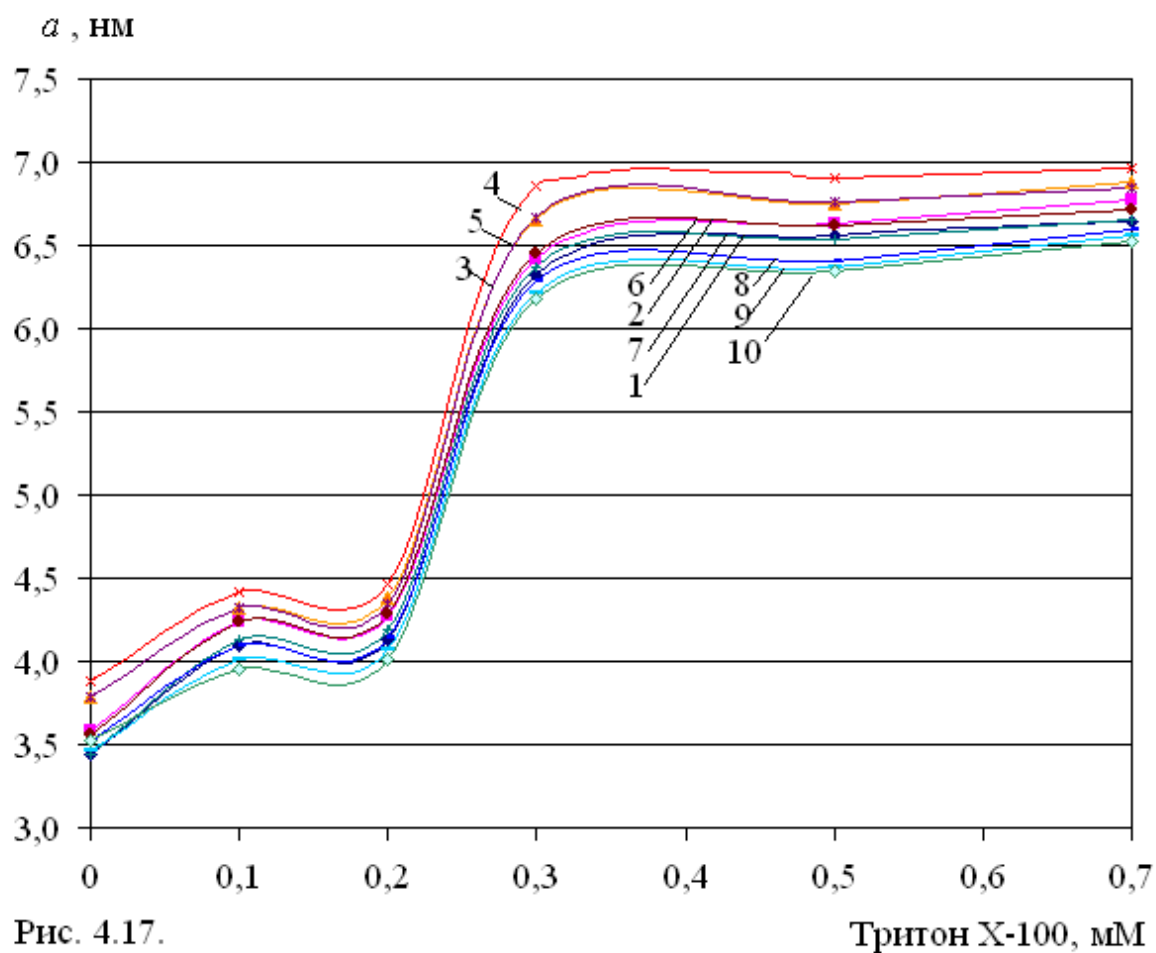


Рис. 4.17.

Тритон X-100, mM

Зависимость эффективного радиуса молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации Тритона X-100 при различных значениях pH: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

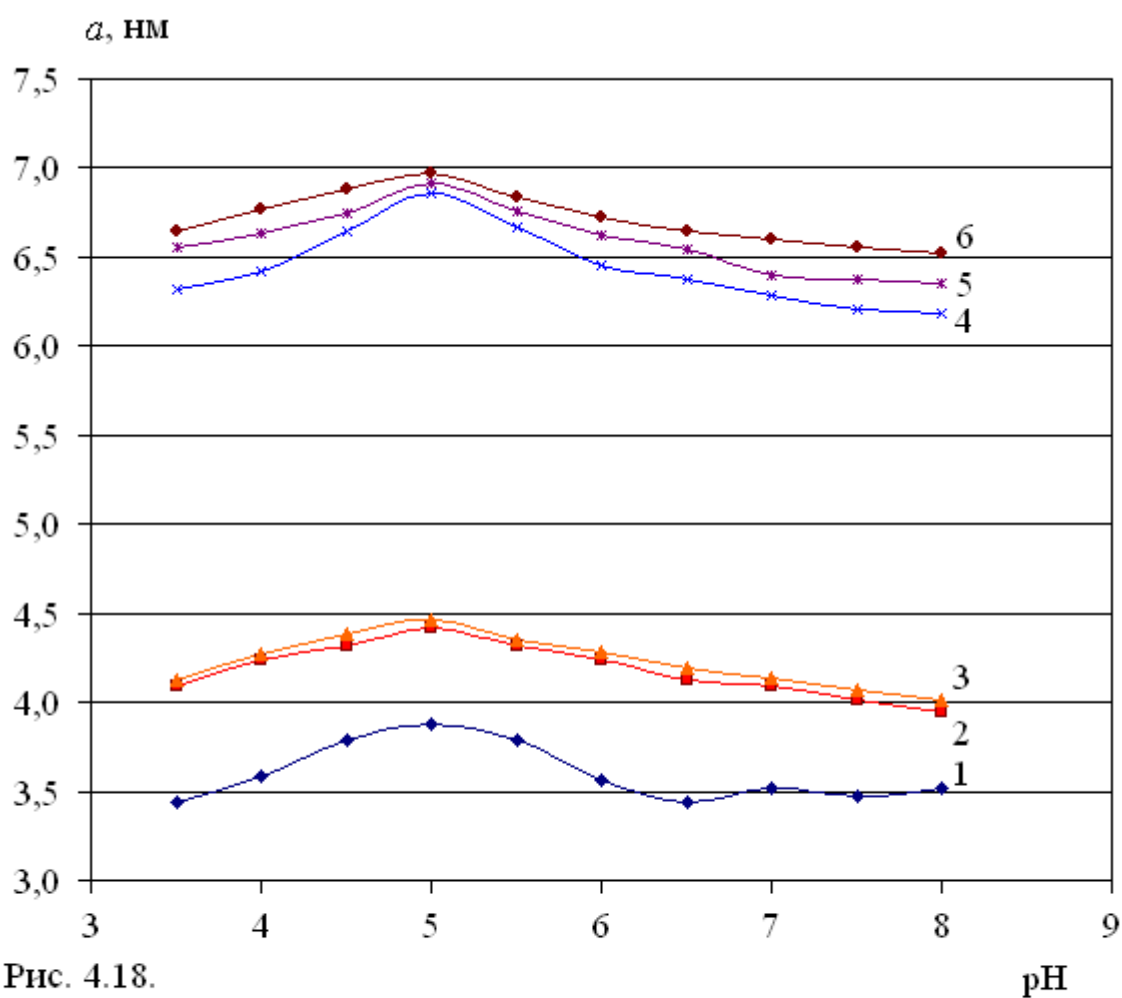


Рис. 4.18.

Зависимость от pH эффективного радиуса молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями Тритона X-100: 0 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,2 мМ (3), 0,3 мМ (4), 0,5 мМ (5), 0,7 мМ (6).

Первое незначительное уменьшение коэффициента вращательной диффузии бычьего альбумина происходит при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100, а второе уже значительное уменьшение этого коэффициента происходит при 0,3 мМ Тритона X-100. Дальнейшее увеличение концентрации Тритона X-100 (больше 0,3 мМ) практически не влияет на коэффициент вращательной диффузии бычьего альбумина.

В области концентраций 0,1 – 0,2 мМ Тритон X-100 (ККМ 0,25 мМ) находится в молекулярной фазе, и молекулы Тритона X-100 взаимодействуют с бычьим альбумином: связывание молекулами белка небольших молекул детергента приводит к незначительному уменьшению коэффициента вращательной диффузии бычьего альбумина. При 0,3 мМ Тритона X-100 (и при больших концентрациях) детергент находится в мицеллярной фазе, и мицеллы Тритона X-100 взаимодействуют с бычьим альбумином: связывание молекул белка с крупными мицеллами детергента приводит к значительному уменьшению коэффициента вращательной диффузии бычьего альбумина.

На рис. 4.14 представлена зависимость коэффициента вращательной диффузии бычьего альбумина от рН растворов, содержащих различные концентрации Тритона X-100. В растворах с Тритоном X-100 коэффициент вращательной диффузии бычьего альбумина нелинейно зависит от рН с минимумом примерно при рН 5,0, что указывает на наилучшее связывание молекул (при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) или мицелл (при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) детергента с белком при этом значении рН. При рН 5,0, лежащем вблизи изоэлектрической точки бычьего альбумина (4,9), молекулы бычьего альбумина в целом электрически нейтральны и поэтому с ними наиболее интенсивно связываются нейтральные молекулы или мицеллы Тритона X-100.

На рис. 4.15 представлены зависимости времени вращательной релаксации молекул бычьего альбумина от концентрации Тритона X-100 в растворах с различными значениями рН. Видно, что в растворах с Тритоном X-100 происходит увеличение времени вращательной релаксации бычьего альбумина по сравнению с растворами без детергента: небольшое увеличение – при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100 и существенное увеличение – при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100.

На рис. 4.16 представлены зависимости времени вращательной релаксации молекул бычьего сывороточного альбумина от рН в растворах с различными концентрациями Тритона X-100. В растворах с Тритоном X-100 время вращательной релаксации бычьего альбумина нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее связывание молекул (0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) или мицелл (0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) детергента с белком при этом значении рН. Зависимости

времени вращательной релаксации молекул альбумина человека от рН и от концентрации Тритона X-100 имеют аналогичный характер.

На рис. 4.17 представлены зависимости эффективного радиуса молекул бычьего сывороточного альбумина от концентрации Тритона X-100 при различных значениях рН. В растворах с Тритоном X-100 происходит увеличение эффективного размера молекул бычьего альбумина по сравнению с растворами без детергента: незначительное увеличение – при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100 (детергент в молекулярной фазе) и существенное увеличение – при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100 (детергент в мицеллярной фазе). Мицеллы Тритона X-100 солюбилизируют молекулы бычьего альбумина, степень солюбилизации белка увеличивается с увеличением содержания детергента вплоть до выхода на плато при концентрации Тритона X-100, большей 0,4 – 0,5 мМ.

Изменения эффективного радиуса молекул бычьего альбумина в растворах Тритона X-100 аналогичны изменениям эффективного радиуса молекул альбумина человека в растворах этого же детергента, что объясняется одинаковым механизмом солюбилизации с помощью Тритона X-100 двух типов альбуминов, принадлежащих к одному гомологичному семейству белков. При солюбилизации происходит встраивание молекул белка в мицеллы Тритона X-100. Для солюбилизации нужен такой детергент, который не нарушал бы вторичную и третичную структуры белка, а лишь связывался с гидрофобными участками белковой молекулы. Для солюбилизации белков необходимо учитывать заряд детергента (лучше нейтральный детергент), его ККМ (для Тритона X-100 это 0,25 мМ) и размер мицелл детергента (мицеллы Тритона X-100 при комнатной температуре имеют диаметр 7 – 9 нм). Из полученных результатов видно, что при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100 его мицеллы эффективно солюбилизируют молекулы как сывороточного альбумина человека, так и бычьего сывороточного альбумина.

На рис. 4.18 представлены зависимости эффективного радиуса молекул бычьего сывороточного альбумина от рН растворов с различными концентрациями Тритона X-100.

В растворах с Тритоном X-100 эффективный радиус молекул бычьего альбумина нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 5,0, что указывает на наилучшее связывание нейтральных молекул (при 0,1 – 0,2 мМ Тритона X-100) или нейтральных мицелл (при 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100) детергента с белком при этом значении рН, так как молекулы бычьего альбумина при этом значении рН (вблизи его изоэлектрической точки 4,9) в целом электрически нейтральны. Таким образом, наиболее эффективная солюбилизация молекул сывороточных альбуминов (как человека, так и быка) с помощью детергента Тритона X-100 (при концентрациях 0,3 – 0,7 мМ) происходит при рН 5,0.

Основные результаты и выводы

1. По анализу триптофановой поляризованной флуоресценции сывороточных альбуминов исследована вращательная диффузия этих белков в растворах с ионным (ДСН) и нейтральным (Тритон X-100) детергентами.
2. По анализу триптофановой флуоресценции сывороточного альбумина человека определены параметры вращательной диффузии (время вращательной релаксации, коэффициент диффузии, эффективный радиус молекул) этого белка в растворах с анионным детергентом ДСН, на основании чего получена информация о денатурации этого белка под действием ДСН при различных значениях рН.
3. Обнаружен сложный стадийный характер денатурации альбумина человека под действием ДСН: первая стадия – разрыхление глобул, вторая стадия – разворачивание аминокислотной цепи белка. При значениях рН, меньших рI белка, денатурация белка под действием ДСН проходит через две стадии, тогда как при значениях рН, больших рI белка, денатурация под действием ДСН менее глубока и проходит только первую стадию.
4. По анализу триптофановой флуоресценции двух сывороточных альбуминов (человека и быка) определены параметры вращательной диффузии (время вращательной релаксации, коэффициент диффузии, эффективный радиус Эйнштейна) этих белков в растворах с нейтральным детергентом Тритоном X-100, на основании чего получена информация о сольбилизации этих белков в растворах с Тритоном X-100 при различных значениях рН.
5. По анализу параметров вращательной диффузии сывороточных альбуминов обнаружено, что эффективная сольбилизация обоих белков, принадлежащих к одному гомологичному семейству, в растворах Тритона X-100 достигается при концентрациях 0,3 – 0,7 мМ Тритона X-100, незначительно больших его ККМ (0,25 мМ), при этом наиболее значительный эффект имеет место при рН 5,0.

Список цитируемой литературы

1. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем, 1994.
2. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Люминесценция и ее измерения, 1989.
3. Лакович Дж. Принципы флуоресцентной спектроскопии, 1999.
4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот, 2002.
5. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков, 1965.
6. Dobretsov G.E., Kurek N.K., Syrejshchikova T.I., Yakimenko M.N., Clarke D.T., Jones G.R., Munro I.H. Time-resolved spectroscopy of the probe fluorescence in the study of human blood protein dynamic structure on SR beam. // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2000, v. 448, p. 471-477.
7. Trynda-Lemiesz L., Luczkowski M. Human serum albumin: spectroscopic studies of the paclitaxel binding and proximity relationships with cisplatin and adriamycin. // Journ. Inorg. Biochem., 2004, v. 98, № 11, p. 1851-1856.
8. Zamora R., Hidalgo F.J. Comparative methyl linoleate and methyl linoleate oxidation in the presence of bovine serum albumin at several lipid/protein ratios. // Journ. Agric. Food Chem., 2003, v. 51, № 16, p. 4661-4667.
9. Bito R., Shikano T., Kawabata H. Isolation and characterization of denatured serum albumin from rats with endotoxemia. // BBA, 2003, v. 1646, p. 100-111.
10. Kashiwakuma T., Hasegawa A., Kajita T., Takata A., Mori H., Ohta Y., Tanaka E., Kiyosawa K., Tanaka T., Tanaka S., Hattiri N., Kohara M. Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). // Journ. Immunological Methods, 1996, v. 190, № 1, p. 79-89.
11. Singh A.K., Darshi M. A fluorescence study of (4-((1E,3E)-4-(4-(dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dienyl)phenyl)methanol and its bioconjugates with bovine and human serum albumins. // New Journ. Chemistry, 2004, v. 28, № 1, p. 120-126.
12. Сырейщикова Т.И., Грызунов Ю.А., Смолина Н.В., Добрецов, А.А. Комар Г.Е., Узбеков М.Г., Мисионжник Э.Ю., Молодецких А.В., Максимова Н.М. Пикосекундная флуоресцентная спектроскопия белков как новый подход к оценке эффективности терапии психических заболеваний. // Альманах клинической медицины, 2008, т. 17-1, с. 94-97.
13. Григорян К. Р. Флуоресцентный анализ структурных изменений сывороточного альбумина человека, индуцированных низкими температурами в водно-диметилсульфоксидных растворах. // [Журнал физической химии](#), 2011, № 2, с. 372-376.
14. Gelamo E.L., Silva C.H.T.P., Imasato H., Tabak M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. // BBA, 2002, v. 1594, p. 84-99.
15. Власова И.М., Салецкий А.М. Флуоресценция триптофана сывороточного альбумина человека при денатурации под действием додецилсульфата натрия. // Химическая физика, 2009, т. 28, с. 66-71.
16. Власова И.М., Салецкий А.М. Исследование денатурации сывороточного альбумина человека под действием додецилсульфата натрия по собственной флуоресценции белка. // Журнал прикладной спектроскопии, 2009, т. 76, № 4, стр. 564-570.

17. Власова И.М., Салецкий А.М. Поляризованная флуоресценция в исследовании вращательной диффузии альбумина человека при денатурации под действием ДСН. // Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика. Астрономия, 2011, № 1, стр. 58-62.
18. Diaz X., Abuin E., Lissi E. Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations Its relationship to surfactant-protein association. // Journal of Photochemistry and Photobiology, 2003, № 155, с. 157-162
19. Фенлинь Сюй, Цянчжай Чжан, Иньхуа Юань, Сяоцзюнь Яо, Гуйрун Цу, Юань Лу. Взаимодействие 1-цианэтил-5-хлорурацила с человеческим и бычьим сыворотным альбумином. // [Журнал прикладной спектроскопии](#), 2008, № 5, с. 747-735.
20. [Задимова](#) Н. М., Ямпольская Г. П., [Филатова](#) Л. Ю. Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с неионогенным ПАВ Твин-80 в водных растворах: комплексообразование и ассоциация. // [Коллоидный журнал](#), 2006, № 2, с. 187-197.
21. Яскаран Ламба, Субханкар Пол, Вивек Хасиджа, Ручи Аггарвал, Тапан К. Шодхури. Наблюдение за путями сворачивания и разворачивания белка через изменения поверхностной гидрофобности с использованием флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма. // [Биохимия](#), 2009, № 4, с. 486-492.
22. Sun C., Yang J., Li L., Wu X., Liu Y., Liu S. Advanced in the study of luminescence probes for proteins. // Journ. Chromatography B, 2004, p. 173-190.
23. 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, с. 661-665.
24. Власова И.М., Салецкий А.М. Флуоресценция молекулярного зонда эозина в растворах сывороточного альбумина человека с органическим и неорганическим лигандами. // Химическая физика, 2008, т. 27, № 4, стр. 66-70.
25. 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, p. 45-48.
26. Shaikh S.M.T., Seetharamappa J., Kandagal P.B., Manjunatha D.H., Ashoka S. Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. // Dyes and Pigments, 2006, с. 1-6
27. 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. 5, p. 1027-1031.
28. 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.