

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

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**  
студентки 605 группы  
Царфиной Натальи Дмитриевны

**ДЕНАТУРАЦИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПОД  
ДЕЙСТВИЕМ АНИОННОГО ДЕТЕРГЕНТА ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА  
НАТРИЯ ПО АНАЛИЗУ ТРИПТОФАНОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ  
БЕЛКА**

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

Москва-2013

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	3
<b>Глава 1. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)</b> .....	5
§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	5
§1.2. Ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) в белках и их флуоресценция .....	10
§1.3. Ионные детергенты .....	12
§1.4. Анализ триптофановой флуоресценции белков в исследованиях их структуры и свойств .....	15
<b>Глава 2. Методическая часть экспериментов</b> .....	25
§2.1. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и ДСН с различными значениями рН .....	25
§2.2. Методика экспериментов для исследования спектров флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с ДСН с различными значениями .....	25
<b>Глава 3. Исследование неполяризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с анионным детергентом ДСН (собственные результаты и их обсуждение)</b> .....	26
<b>Глава 4. Исследование поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с анионным детергентом ДСН (собственные результаты и их обсуждение)</b> .....	36
§4.1. Исследование поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах ДСН с различными значениями рН.....	36
§4.2. Определение параметров вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах ДСН с различными значениями рН.....	41
<b>Основные результаты и выводы работы</b> .....	48
<b>Список цитируемой литературы</b> .....	49

## Введение

Многие биологические и фармацевтические системы содержат белки и детергенты. Детергенты представляют собой органические амфифильные соединения, молекулы которых имеют гидрофильные и гидрофобные участки. 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.

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

Одним из широко применяющихся детергентов в медицинских, косметических и фармацевтических исследованиях является анионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН). ДСН при определенных концентрациях является денатурирующим агентом, что используется в биохимических исследованиях – в электрофорезе в полиакриламидном геле.

Денатурацией называют существенное изменение вторичной и третичной структуры белка, т.е. нарушение, разупорядочивание системы нековалентных взаимодействий, не затрагивающее его ковалентной пептидной структуры. Денатурация, как правило, сопровождается утратой белком функциональных свойств, что обуславливает интерес к изучению механизмов белковой денатурации.

Представляет интерес изучить денатурацию бычьего сывороточного альбумина (молекулярная масса 64 кДа, изоэлектрическая точка pI 4,9) – транспортного белка плазмы крови – под действием ДСН.

Молекулы бычьего сывороточного альбумина (БСА) состоят из одной аминокислотной цепочки из 582 аминокислотных остатков. Третичная структура БСА определяется тремя доменами. Бычий сывороточный альбумин содержит два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214. Наличие в молекуле БСА двух триптофановых остатков позволяет использовать для исследования данного белка метод флуоресцентного анализа, а именно анализ собственной триптофановой флуоресценции белка.

Выбор БСА в данной работе как модельного белка обусловлен важной ролью этого белка в плазме крови, определяемой широким разнообразием функций этого белка: альбумин обеспечивает коллоидно-осмотическое давление крови, альбумин регулирует вместе с другими белками плазмы рН крови, альбумин служит переносчиками различных метаболитов и лекарственных препаратов.

Целью данной работы является исследование с применением методов флуоресцентного анализа денатурации бычьего сывороточного альбумина (БСА) под действием анионного детергента додецилсульфата натрия (ДСН) в растворах с различными значениями рН.

В рамках данной цели поставлены две задачи: первая – провести изучение неполяризованной собственной триптофановой флуоресценции БСА в растворах с ДСН и вторая – провести исследование поляризованной триптофановой флуоресценции БСА в растворах с ДСН и на основе анализа поляризованной флуоресценции определить параметры вращательной диффузии молекул БСА в растворах с ДСН при различных значениях рН.

# Глава 1. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)

## §1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Полная энергия молекулы  $E$  складывается из энергии электронного возбуждения  $E_{\text{э}}$ , колебательной энергии  $E_{\text{кол}}$  и энергии вращения молекулы как целого  $E_{\text{вр}}$  (рис. 1.1):

$$E = E_{\text{э}} + E_{\text{кол}} + E_{\text{вр}}. \quad (1)$$

Слагаемые существенно различаются по порядку величины:

$$E_{\text{э}} > E_{\text{кол}} > E_{\text{вр}} \quad (2)$$

При переходе из состояния с более высокой энергией  $E_1$  в состояние с меньшей энергией  $E_2$  происходит выделение энергии в виде кванта света с волновым числом  $\nu$ , а при обратном переходе – его поглощение:

$$\nu = (E_1 - E_2)/hc \quad (3)$$

Электронная спектроскопия связана с изучением энергетических переходов между различными электронными состояниями атомов и молекул. Электронные спектры многоатомных молекул исследуются обычно как спектры поглощения и как спектры люминесценции.

Спектры поглощения возникают в результате переходов из основного электронного состояния в возбужденные за счёт поглощения квантов электромагнитного излучения, а спектры люминесценции – в результате перехода молекулы из возбужденного состояния в основное с испусканием электромагнитного излучения. В процессе люминесценции предусматривается предварительный перевод молекул в возбужденное состояние, например, облучением исследуемого вещества, в процессе которого происходит поглощение молекулами квантов излучения.

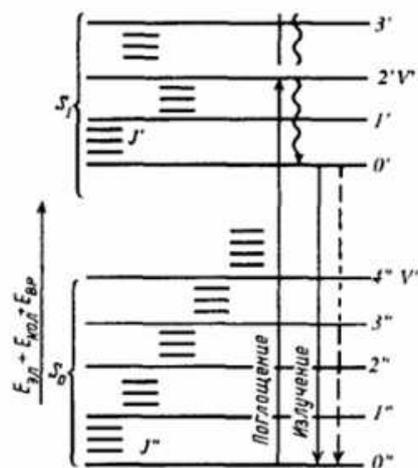


Рис. 1.1. Электронные ( $S_0, S_1$ ), колебательные ( $V', V''$ ) и вращательные ( $J', J''$ ) уровни двухатомной молекулы

Свечение вещества, возникающее при переходе молекул из возбужденного состояния в основное, называют люминесценцией.

Люминесценция (рис. 1.2) 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].

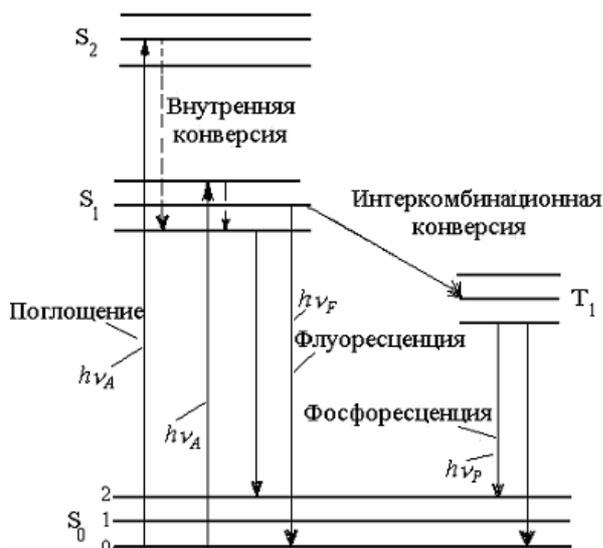


Рис. 1.2. Излучательные и безызлучательные переходы между состояниями одинаковой и различной мультиплетности.

При переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность, наблюдается флуоресценция: обычно между синглетными первым возбужденным и основным состояниями  $S_1 \rightarrow S_0$ . 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, характеризующемуся длительным «послесвечением».

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.

Люминесценция является неравновесным процессом, так как после излучения молекула долгое время может оставаться в невозбужденном состоянии (хотя в принципе она может быть возбуждена), т.е. в общем случае не предполагается существование равновесия между внешним полем излучения и свечением молекул. В реальных условиях наблюдается одновременное свечение огромного числа молекул, которые излучают свет независимо друг от друга, давая некогерентное излучение. При этом происходит преобразование поглощенной энергии в собственное излучение, что отличает люминесценцию от явлений рассеяния и отражения света.

Флуоресцентные спектральные данные обычно представляют в виде спектров испускания. Спектр испускания флуоресценции – это зависимость интенсивности флуоресценции от длин волн или волновых чисел. Каждой полосе поглощения первого электронного возбужденного состояния соответствует полоса флуоресценции. Спектры испускания сильно зависят как от химической структуры флуорофора, так и от растворителя, в котором флуорофор растворен.

Фотолюминесценция возникает за счет поглощаемой энергии возбуждающего света. Однако лишь часть ее превращается в энергию люминесценции. Эффективность этого процесса принято характеризовать выходом люминесценции. Различают энергетический и квантовый выход люминесценции.

Энергетическим выходом люминесценции называют отношение энергии, испускаемой в виде люминесценции  $E_l$ , к энергии поглощенного возбуждающего света  $E_n$ :

$$B_{эн} = E_l / E_n. \quad (4)$$

Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа испущенных квантов люминесценции  $N_l$  к числу поглощенных квантов возбуждающего света  $N_n$ :

$$B_{кв} = N_{л} / N_{п}. \quad (5)$$

Легко установить соотношение между этими двумя величинами. Действительно, так как энергия кванта равна  $h\nu$ , то для  $B_{эн}$  можно записать

$$B_{эн} = (N_{л} / N_{п}) (h\bar{\nu}_{л} / h\bar{\nu}_{п}) = B_{кв} (\bar{\nu}_{л} / \bar{\nu}_{п}), \quad (6)$$

где  $\bar{\nu}_{л}$  и  $\bar{\nu}_{п}$  — средние эффективные частоты излучаемого и поглощаемого света,  $h$  — постоянная Планка. Так как  $\bar{\nu}_{п} > \bar{\nu}_{л}$ , то  $B_{эн} < B_{кв}$ .

С.И. Вавилов показал, что энергетический выход люминесценции растворов органических веществ может достигать значения  $\sim 0,8$ . В этом случае величина квантового выхода люминесценции близка к единице. Таким образом, часть энергии возбуждения практически всегда расходуется на развитие безызлучательных переходов.

Значение квантового выхода исследуемого раствора рассчитывается по формуле  $B = B_{stand} (K_{sample} / K_{stand})$ , где  $B_{stand}$  — значение квантового выхода флуоресценции эталонного красителя;  $K_{sample}$ ,  $K_{stand}$  — для исследуемого соединения и эталонного красителя тангенсы углов наклона линейной аппроксимации зависимостей интегральной по спектру интенсивности испускания флуоресценции от значения оптической плотности на длине волны возбуждения  $I_{fluo}(D_{\lambda})$  при различных концентрациях.

Молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропны, поэтому люминесцентное излучение каждой молекулы частично поляризовано. Однако, если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция неполяризованной.

Для количественной оценки поляризованной флуоресценции вводится понятие степень поляризации флуоресценции:

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) \quad (7)$$

где  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  - соответственно параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции.

Также используется и другая характеристика поляризованной флуоресценции – степень анизотропии излучения:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) \quad (8)$$

Между степенью поляризации  $P$  и степенью анизотропии излучения  $r$  существует связь

$$r = 2P / (3 - P) \quad (9)$$

В теории поляризованной люминесценции принято использовать модель анизотропных осцилляторов. Данная модель позволяет описать все основные закономерности поляризованной люминесценции растворов сложных органических молекул.

Классическая осцилляционная модель позволила развить теорию вращательно деполяризации люминесценции, которая имеет место в жидких средах. Дело в том, что молекулы, находящиеся в жидких растворах, совершают броуновские движения, которые можно разделить на поступательные движения и броуновские вращения молекулы. При возбуждении вещества поляризованным светом создается анизотропия в распределении возбужденных молекул (диполей). За счет процессов броуновского вращения (поступательное броуновское движение не оказывает влияния на поляризацию люминесценции) происходит уничтожение преимущественной ориентации возбужденных осцилляторов (молекул). Поэтому при достаточно малой вязкости раствора к моменту излучения света молекулами их распределения может оказаться изотропным и, как следствие этого, люминесценция будет неполяризованной. Говорят, что люминесценция оказывается полностью деполяризованной. Количественная теория вращательной деполяризации впервые была предложена В. Л. Левшиным и позднее Ф. Перреном с использованием модели вращательной диффузии [2].

## §1.2. *Ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) в белках и их флуоресценция*

Белки количественно преобладают над всеми другими макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов [3-4]. Молекулы белков представляют собой очень длинные полипептидные цепи, построенные из многих аминокислотных звеньев. Белки служат теми инструментами, посредством которых генетическая информация получает свое реальное воплощение. В клетке существует тысячи разновидностей белков и каждый из них выполняет специфическую функцию, определяемую соответствующим геном. Таким образом, белки – это не только наиболее многочисленные, но и исключительно разнообразные по своим функциям макромолекулы. Все белки во всех организмах, независимо от их функций или биологической активности, построены из одного и того же основного набора 20 стандартных аминокислот, каждая из которых, взятая в отдельности, не обладает биологической активностью. Белки отличаются друг от друга своей последовательностью аминокислотных звеньев. При этом одни аминокислоты встречаются в белке один раз, тогда как другие значительно чаще.

Ни одна из двадцати аминокислот [4, 5] входящих в состав белков, не поглощает в видимой области спектра и лишь три из них, а именно триптофан Trp (рис. 1.3), фенилаланин Phe (рис. 1.4) и тирозин Tyr (рис. 1.5), обладают заметным поглощением в ультрафиолетовой области.

Триптофан и фенилаланин относятся к гидрофобным аминокислотам.

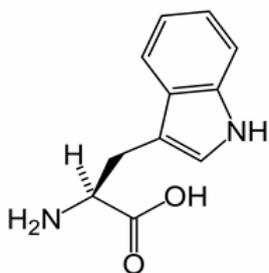


Рис. 1.3. Структурная формула триптофана.

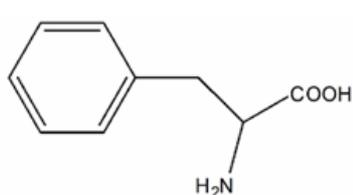


Рис. 1.4. Структурная формула фенилаланина

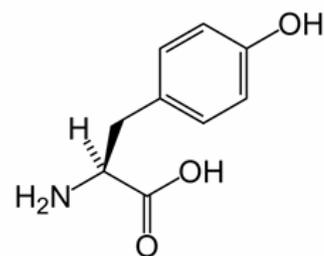


Рис. 1.5. Структурная формула тирозина

Флуоресценция белков обычно возбуждается в максимуме их поглощения при 280 нм. Следовательно, фенилаланин не возбуждается в большинстве

экспериментальных случаев.

К тому же квантовый выход фенилаланина в белках мал, так что испускание этого аминокислотного остатка при возбуждении 280 нм наблюдается редко.

Поглощение белков при 280 нм в основном связано с тирозиновыми и триптофановыми остатками.

При длинах волн более 295 нм поглощает главным образом триптофан. Поэтому предполагается, что его флуоресценция может быть селективно возбуждена в диапазоне 295 – 305 нм. Спектры поглощения ароматических аминокислот приведены на рис. 1.6.

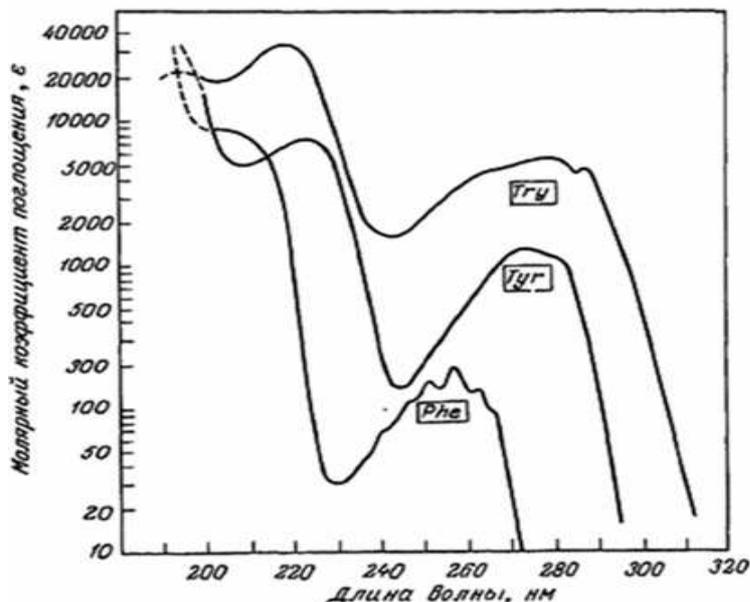


Рис.1.6. Спектры поглощения ароматических аминокислот.

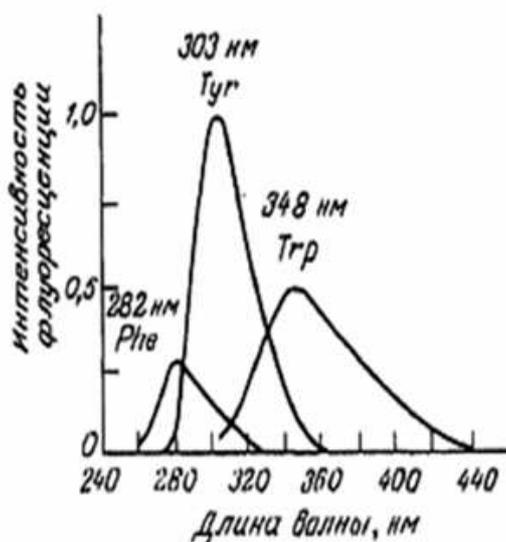


Рис.1.7. Флуоресцентные спектры испускания ароматических аминокислот. 348 нм и сильно зависит от полярности.

Флуоресцентные спектры испускания ароматических аминокислот при возбуждении в максимумах их поглощения приведены на рисунке 1.7.

Испускание тирозина в воде происходит при 303 нм и сравнительно нечувствительно к полярности растворителя.

Максимум испускания триптофана в воде находится при

Тирозиновые остатки могут претерпевать ионизацию в возбужденном состоянии, приводящую к потере протона ароматической гидроксильной группой. Гидроксильная группа может диссоциировать в течение времени жизни возбужденного состояния, что приводит к тушению флуоресценции тирозина.

Максимумы испускания триптофана и его производных очень чувствительны к полярности растворителя, равно как и к специфическим взаимодействиям между растворителем и идольным кольцом. Поэтому можно ожидать, что максимумы испускания белков должны зависеть от тех факторов, которые влияют на экспонирование триптофановых остатков в водную фазу. Например, спектр испускания человеческого сывороточного альбумина претерпевает коротковолновый сдвиг по сравнению с испусканием триптофана в воде. Этот коротковолновый сдвиг интерпретирует как результат экранирования триптофановых остатков от водной фазы белков. Максимумы испускания некоторых белков варьируются главным образом из-за различий усредненной локализации этих остатков в нативных белках. Триптофановые остатки, погруженные внутрь белков, не обязательно должны проявлять структурированное испускание. Скрытые внутри остатки могут быть связаны водородной связью с полярной группой, которая также находится внутри белка.

### ***§1.3. Ионные детергенты***

Детергенты (от лат. *detergere* – мыть, очищать) представляют собой поверхностно-активные вещества (ПАВ) с моющим действием, которое обусловлено их способностью образовывать в воде устойчивые коллоидные растворы. Поверхностная активность детергентов, то есть способность адсорбироваться на границе раздела фаз, связана с амфифильностью их молекул. Амфифильными (от греч. *фило* – любящий и *амфи* – обоих) называют вещества, в молекулах которых имеются четко разграниченные гидрофильные и гидрофобные области, благодаря чему такие молекулы

обладают средством не только по отношению к воде, но и к неполярным органическим растворителям.

В воде молекулы детергентов стремятся ассоциировать друг с другом, образуя мицеллы. Данные системы состоят из большого числа детергентных молекул (обычно от нескольких десятков до нескольких сот), ориентированных в мицелле таким образом, что их неполярные группы формируют внутреннее гидрофобное ядро мицеллы, а гидрофильные полярные группировки находятся на ее поверхности и контактируют с окружающими молекулами воды. Именно благодаря наличию гидрофобного ядра мицеллы способны сольubilизировать, 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. Число агрегации показывает, сколько молекул детергента приходится на одну мицеллу.

В настоящее время известно несколько сот различных детергентов[4]. Все они разделяются на два основных класса: ионные и неионные детергенты, в зависимости от наличия или отсутствия заряженных групп в гидрофильной области их молекул. Представители каждого из этих классов различаются не только химическим строением, но и основными коллоидно-химическими свойствами.

Неионные ПАВ растворяются в воде, не ионизируясь. Растворимость неионных ПАВ 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.

В зависимости от знака заряда поверхностно-активного иона ионные детергенты делятся на анионные, катионные и амфотерные.

Анионными ПАВ называют вещества, содержащие в молекуле гидрофобную часть и одну или несколько полярных групп и диссоциирующие в водном растворе с образованием отрицательно заряженных длинноцепочечных органических ионов, определяющих их поверхностную активность. К ним относятся большинство традиционных ПАВ, в том числе и жировое мыло. Гидрофобная часть обычно представлена предельными, непредельными алифатическими и алкиароматическими цепями. Гидрофобность молекулы обусловлена наличием функциональных групп – COO(H,Me), -OSO<sub>2</sub>O (H,Me), -OSO<sub>3</sub> (H,Me). Разнообразие свойств различных анионных ПАВ объясняется пространственным строением гидрофобной части и наличием промежуточных функциональных групп. Катион в анионных ПАВ может быть не только водородом и металлом, но и органическим образованием. Часто для этих целей применяют ди- и триэтаноламины.

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

К широко используемым анионным детергентам относится додецилсульфат натрия ДСН (рис. 1.8), взаимодействие белка с которым исследовалось в данной работе при помощи флуоресценции.

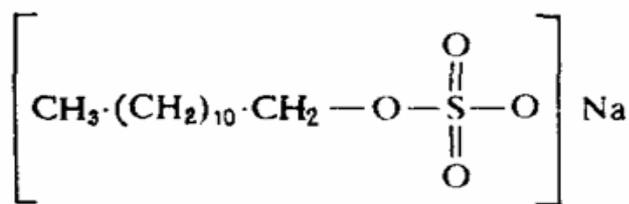


Рис.1.8. Структурная формула ДСН.

ДСН представляет собой белый или кремово-белый порошок. ККМ 8200. Бактерицидная активность наибольшая при низких рН, а при рН 4 активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Вызывает разрушение клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Солюбилизирует белки и создает на них сильный отрицательный заряд [4].

Так же данный детергент широко используется в электрофорезе [5]. Данный метод исследования часто применяется для получения информации о белках. Он позволяет разделять молекулы по некоторым параметрам, такие как размер, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд. В наши дни наиболее часто проводятся электрофоретические исследования белков в полиакриамидном геле. Данный метод популярен из-за своей гибкости, которой он обладает благодаря возможности исследования при разной концентрации геля, содержания детергентов и денатурирующих агентов, а так же разному значению рН.

#### ***§1.4. Анализ триптофановой флуоресценции белков в исследованиях их структуры и свойств***

Современные методы флуоресцентного анализа имеют много преимуществ, среди которых наиболее важны для биологического эксперимента высокая чувствительность, быстрота получения результата, небольшое количество анализируемого образца [6-40].

Изучение вида спектров флуоресценции, их интенсивности нашло широкое применение в медицинских и биологических исследованиях. Флуоресценция биологических объектов может быть собственной (первичная флуоресценция) или возникать за счёт добавления в анализируемую систему специальных веществ (меток, зондов, наномаркеров) или при химической модификации уже имеющихся веществ (вторичная флуоресценция) [6-40].

Собственная флуоресценция простых белков 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.

Длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции многих веществ, в том числе белков, нуклеиновых кислот, коферментов, при комнатной температуре представляют собой обычно пологие кривые с одним максимумом, по форме близкие к кривой нормального распределения [8].

Обнаружено [8], 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).

Методы флуоресцентного анализа в исследованиях белков применяются для определения изменения вторичной структуры белков под влиянием внешних факторов [9], под воздействием лекарственных препаратов [10], для оценки окислительных повреждений белков [11], для исследования белковой денатурации [12], при диагностике заболеваний [13], в исследованиях белковых конъюгатов [14].

Собственная флуоресценция является мощным инструментом для исследования структуры, динамики и процессов сворачивания – разворачивания белков ввиду высокой чувствительности различных параметров флуоресценции триптофановых остатков (положения спектра, квантового выхода, анизотропии флуоресценции и др.) к свойствам их окружения и особенностям локализации в молекуле белка [6, 7].

Применение данных методов в биологии имеет ряд положительных аспектов, таких как возможность использования водных растворов, бесконтактность методов.

В [7] на конкретных примерах рассмотрены современные методические подходы, основанные на явлении собственной флуоресценции белков, которые используются при анализе структурных изменений изолированных белков, природных белковых смесей, а также мембранных белков, вызванных действием физико-химических факторов, сопутствующих криоконсервированию биообъектов. Одним из достаточно простых подходов, позволяющих разделить вклад тирозиновых и триптофановых флуорофоров в собственную флуоресценцию белков, является двухволновой метод регистрации спектров ультрафиолетовой флуоресценции белков, основанный на возбуждении флуоресценции белков светом с длинами волн: 280 нм (общая флуоресценция) и 296 нм (флуоресценция триптофана). Применение данного метода к анализу формы спектра интегрального микросомального белка цитохрома P-450 позволило установить, что встраивание цитохрома P-450 в липидный бислой и его реакция на замораживание–отогрев сопровождается конформационными изменениями белка, зависящими от вида и заряда окружающих белок фосфолипидов.

Получать ценную дополнительную информацию об изменении конформационного состояния биомакромолекул в растворе и в составе мембран позволяет анализ тушения собственной флуоресценции белков. С помощью тушения флуоресценции цитохрома P-450 акриламидом удалось показать, что в присутствии кислых фосфолипидов – фосфатидилсерина и дифосфатидилглицерина уменьшается глубина погружения цитохрома P-450 в липидный матрикс.

В [35] отдельно рассматривалось взаимодействие разных наноматериалов, антибиотиков, онкологических препаратов, противовоспалительных средств, красителей, флаваноидов, и некоторых

ядовитых веществ с сывороточным альбумином человека (САЧ) и бычьим сывороточным альбумином (БСА).

Исследования биологической структуры могут быть выполнены методами собственной УФ-флуоресценции белков, флуоресценции зонда (например, АНС), кругового дихроизма (КД) в дальней и ближней УФ-областях спектра.

В [15] исследованы конформационные изменения глутаминсвязывающего белка из *Escherichia coli* (GlnBP) под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl) и влияние комплексообразования GlnBP с глутамином (Gln) на эти процессы. Интерпретация экспериментальных данных проведена с учетом результатов анализа микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков. Это позволило объяснить незначительный вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию нативного белка, сходство флуоресцентных характеристик GlnBP и GlnBP/Gln и необычный эффект превышения интенсивности триптофановой флуоресценции (длина волны регистрации 365 нм) при возбуждении светом с длиной волны 297 нм по сравнению с флуоресценцией при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Этот эффект объяснен спектральной зависимостью относительного вклада Trp 32 и Trp 220 в поглощение белка. Показано, что зависимость триптофановой флуоресценции белка от длины волны возбуждения должна приниматься в расчет при оценке вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка и в принципе может быть использована при разработке подхода для разложения многокомпонентного спектра флуоресценции белков на составляющие — спектры флуоресценции отдельных триптофановых остатков. Использование параметрического представления флуоресцентных данных показало, что разворачивание как GlnBP, так и GlnBP/Gln является трехстадийным процессом, хотя в случае комплекса GlnBP/Gln эти три стадии существенно перекрываются. Несмотря на сложный характер процесса разворачивания GlnBP, оно полностью обратимо. В работе были изучены процессы

разворачивания и сворачивания GlnBP из *E. coli* в присутствии и в отсутствие лиганда под действием GdnHCl методом собственной флуоресценции.

Исследована триптофановая флуоресценция сывороточного альбумина человека (САЧ) при добавлении в белковый раствор додецилсульфата натрия (ДСН) при различных значениях рН, что позволило получить представление о механизме происходящей под действием ДСН денатурации САЧ [16]. Двухстадийное тушение триптофановой флуоресценции САЧ при увеличении концентрации ДСН указывает на двухстадийный характер денатурации: первая стадия состоит в разрыхлении белковых глобул, вторая – в полном разворачивании аминокислотной цепи белка. При значениях рН, больших изоэлектрической точки белка (рI 4.7), денатурация останавливается на первой стадии. Более эффективно и глубоко (через обе стадии) денатурация САЧ под действием ДСН проходит при значениях рН, меньших рI белка.

Аналогичный результат двухстадийной денатурации САЧ под действием ДСН был получен при анализе поляризованной триптофановой флуоресценции по определению параметров вращательной диффузии молекул САЧ [6].

Используя спектры флуоресценции, исследовали связывание длинной цепи имидазола, 1-тетрадецил-3-метилимидазол бромид (C14mimBr) с бычьим сывороточным альбумином (БСА) [36]. Спектр флуоресценции триптофановых остатков, одних из внутренних флуорофоров БСА, показывает, что триптофан спрятан в гидрофобной среде, и при добавлении C14mimBr происходит денатурация БСА, отражаемая тушением флуоресценции. Были посчитаны константа равновесия (K) и количество сайтов связывания (n).

В [37] исследовали связывание хлорамфеникола (ХФК) с бычьим сывороточным альбумином при 296 К, 303 К и 310 К методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии в видимой и УФ областях. Результаты эксперимента показывают, что механизм взаимодействия ХФК с БСА носит комбинированный характер (динамическое и статическое

тушение) при низких концентрациях ХФК и только динамическое тушение при высоких концентрациях. Были посчитаны константы связывания, количество центров связывания и соответствующие термодинамические параметры взаимодействия систем.

Взаимодействие анионного ПАВ додецилсульфат натрия (ДСН) с водным раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) исследовали с помощью флуоресцентной спектроскопии зонда 1-гидрокси-2-нафтальдегида (ГН12), характерного внутримолекулярного переносчика протонов [38].

Спектры флуоресценции в УФ и в видимом диапазонах используются для получения информации о связывании БСА с перфторированным триметил-1-пропанаминиум йодидом (FC-134). В [39] анализируя результаты при помощи уравнения Штерна-Фольмера, получили, что FC-134 может понижать интенсивность флуоресценции БСА, используя динамический процесс гашения. При помощи маркеров варфарина и ибупрофена, впервые получили информацию о том что FC-134 сначала связывается с Trp-214 в суб-домене ПА БСА.

В результате анализа пространственной структуры белка семейства липокалинов альфа-1-микроглобулина (A1M) человека впервые охарактеризованы микроокружение триптофанов и степень их доступности молекулам растворителя [17]. На основании компьютерного моделирования пространственной структуры A1M и данных по тушению его флуоресценции акриламидом и йодид-ионами сделан вывод о том, что триптофановые остатки в молекуле исследуемого белка в значительной степени экранированы. Обнаружена быстрая конформационная подвижность A1M, обусловленная флуктуациями структуры белка в наносекундном интервале.

В [40] исследовано влияние катионов свинца как представителя класса тяжелых металлов на флуоресцентные характеристики и фотофизические параметры (интенсивность и степень поляризации флуоресценции, сечение поглощения, время жизни возбужденного состояния, скорости синглет-триплетной конверсии и обратимой фотодеградации) триптофана в водном

растворе двухтриптофанового белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) – и для сравнения в водном растворе чистого триптофана. Установлено, что влияние свинца на флуоресцентные характеристики БСА проявляется при отношении молярных концентраций катионов металла и макромолекул БСА более 10 и обусловлено динамическим тушением возбужденного состояния, агрегацией белка и ростом скорости синглет-триплетной конверсии (эффектом тяжелого атома) в молекулах триптофана.

В [18] был получен конъюгат, содержащий остатки витамина Н (биотин; Bt) и гормон щитовидной железы тироксин (Т4). Методами электронной спектроскопии, иммуноферментного анализа и компьютерного моделирования изучены взаимодействия конъюгата Bt-Т4 с одним или одновременно с двумя связывающими белками, проявляющими сродство к Bt или Т4.

Изучено влияние магнитного поля частотой 8 Гц 25 мкТл на собственную флуоресценцию сывороточного альбумина в воде и воде с бензолом [19]. Показано, что воздействие магнитного поля на растворы альбумина приводит к изменениям пространственной структуры макромолекулы. Магнитоиндуцированные изменения собственной флуоресценции сывороточного альбумина более выражены в условиях «структурного возмущения», вызванного нагрузкой данного белка неспецифическим низкомолекулярным гидрофобным лигандом – бензолом.

В [20] изучали процессы сворачивания - разворачивания актина и свойств возникающих при этом промежуточных и неправильно свернутых состояний. Был сделан подробный анализ свойств микроокружения и особенностей локализации триптофановых остатков актина, позволяющий сделать вывод о том, что основной вклад во флуоресценцию нативного актина вносят внутренние, локализованные в гидрофобных областях триптофановые остатки Trp340 и Trp356, в то время как триптофановые остатки Trp79 и Trp86 затушены.

В [21] из кораллового полипа *Zoanthus* sp. клонировали ген нового красного флуоресцентного белка, названного *zoan2RFP*, который является гомологом хорошо известного зеленого флуоресцентного белка GFP из медузы *Aequorea Victoria*. На ранних стадиях созревания белок *zoan2RFP* обладает зеленой флуоресценцией, которая затем сменяется красной.

Так же изучены спектральные характеристики трех мономерных флуоресцентных белков – флуоресцентных таймеров (ФТ), созданных из исходного белка *mCherry* [22]. Основной особенностью ФТ является способность изменять свою флуоресценцию с голубой на красную во времени. Полученные варианты характеризуются большим (Б), средним (С) и малым (М) временем созревания хромофора. Время перехода от голубой флуоресценции к красной обратно пропорционально температуре. При 37° С, максимумы голубой флуоресценции наблюдаются через 0,25, 1,2 и 9,8 часа для очищенных МФТ, СФТ и БФТ, соответственно. Полу максимумы красной флуоресценции у этих белков наблюдаются через 3,9, 7,1 и 28 часов. Флуоресцентные свойства исследованных вариантов ФТ позволяют изучать процессы с существенно отличающимися временными характеристиками.

В [23] изучены процессы сворачивания-разворачивания дисульфидизомеразы С (*DsbC*) из *Escherichia coli* под действием *GdnHCl*. Анализ экспериментальных данных, полученных с помощью метода собственной флуоресценции, проводили совместно с анализом информации о пространственной структуре белка, содержащейся в Банке белковых структур (PDB). Показано, что атомы серы дисульфидной связи Cys 141- Cys 163 расположены далеко от Trp 140 и не могут выступать в роли тушителей триптофановой флуоресценции. В качестве потенциальных тушителей флуоресценции могут рассматриваться остатки Met 136 и His 170. Только три тирозиновых остатка (Tyr 171, Tyr38 и Tyr 52) из восьми в каждой субъединицы *DsbC* вносят вклад в суммарную флуоресценцию белка. Так же получена информация об одностадийном характере денатурации *DsbC* под действием *GdnHCl* и показана обратимость этого процесса.

Изучена флуоресценция алкогольоксидазы метилотрофных дрожжей в присутствии этанола и азид натрия [24]. Кинетика затухания флуоресценции отражает гетерогенность микроокружения излучающих остатков триптофана. Фермент имеет два центра связывания азид: один- аллостерический, другой в области активного центра; взаимодействие азид с последним способствует стабилизации структуры белка

В [25] описаны проблемы, решение которых требует измерения внутриклеточной подвижности макромолекул, в том числе цитоплазмально-ядерного транспорта и латеральной подвижности мембранных рецепторов. С использованием двух основных методов: восстановления флуоресценции после фотоотбеливания и лазерной конфокальной сканирующей микроскопии были качественно и количественно описаны процессы внутриклеточного транспорта, особенно цитоплазмально-ядерного.

Установлено, что проведение процедуры многократного замораживания-размораживания сыворотки крови, также как и хранение в течение 30 суток при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , не влияет на форму спектров флуоресценции и положение максимума [26]. Однократное размораживание сыворотки крови не приводит к изменениям интенсивности флуоресценции в максимуме спектра и показателей ее протеолитической и ингибиторной активности.

Регистрировали перекисное окисление липидов (ПОЛ) в липопротеинах низкой и очень низкой плотности (ЛНП) с помощью флуоресцентных зондов антрацен, 4-диметиламинохалкон и 3-метоксибензантрон [27]. Спектры флуоресценции зондов в нативных ЛНП+ЛОНП (находившихся в холодильнике) затухают при окислении (после их инкубации в течение 20 ч).

Методами флуоресцентной спектроскопии с использованием зондов таких как: пирен и 1-алининонафталин-8-сульфонат, было установлено, что отличительными особенностями структурной организации мембран эритроцитов девочек-подростков и молодых женщин при латентном

дефиците железа является снижение микровязкости в поверхностных слоях липидного бислоя и увеличение трансмембранной проницаемости [28].

В [29] методами триптофановой флуоресценции выполнено изучение влияния аминокислотных замен по остатку R96 (R96G, R96A, R96C, R96S) на структуру и стабильность Зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

Флуоресцентные методы использовали для экологического мониторинга полей разных районов Улан-Батора [30]. Анализ флуоресцентных кривых побегов тополей показал изменение состояния пула хинонов, скорости электронного транспорта в фотосистеме 2, уменьшение антенн и числа активных реакционных центров.

В [31] было показано, что уровень флуоресценции битирозина поверхностных и внутриклеточных белковых структур возрастает после воздействия излучением плазмы в эритроцитах как интактных животных, так и животных с опухолью. Кратковременное воздействие излучением плазмы на эритроциты интактных животных приводит к переходу триптофана из «скрытой» формы в экспонированную, увеличение времени воздействия вызывает окисление триптофана. Значительных изменений флуоресценции триптофана надмембранных и внутриклеточных белков эритроцитов животных с лимфосаркомой Плисса после воздействия излучением плазмы не происходит.

В [32] продемонстрирована возможность получения белков биосинтетическим путем с заменой ряда ключевых аминокислот на их элементоорганические аналоги.

## **Глава 2. Методическая часть экспериментов**

### ***§2.1. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и ДСН с различными значениями рН***

Были приготовлены растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) путем разведения белка до концентрации 5 мкМ в двух различных буферных системах: 1) 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{KOH}$ , рН (3,5 – 5,0) и 2) 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$ , рН (5,5 – 8,0).

В белковые растворы с различными значениями рН добавлялись различные концентрации додецилсульфата натрия ДСН (0,5 мМ; 1 мМ; 2,0 мМ; 3 мМ; 4,0 мМ; 5,0 мМ; 7,0 мМ), а так же добавлялись различные концентрации сахарозы для изменения вязкости растворов -10 мМ, 100 мМ и 200 мМ.

### ***§2.2. Методика экспериментов для исследования спектров флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с ДСН с различными значениями рН***

Растворы бычьего сывороточного альбумина с различными концентрациями ДСН и различными значениями рН исследовались методом флуоресцентного анализа по спектрам собственной триптофановой флуоресценции белка.

Исследования проводились с помощью спектрофлуориметра LS 55 (Perkin Elmer). Спектрально-флуоресцентные характеристики образцов получены при комнатной температуре.

Триптофановая флуоресценция белка возбуждалась светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм и регистрировалась в диапазоне 300 – 500 нм. Спектральные щели монохроматора возбуждения и монохроматора эмиссии были равными 2,5 нм. Полученные спектры обрабатывались программой FL Winlab (Perkin Elmer).

### **Глава 3. Исследование неполяризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с анионным детергентом ДСН (собственные результаты и их обсуждение)**

В данной главе представлены результаты исследований механизма денатурации молекул бычьего сывороточного альбумина под действием различных концентраций ДСН при различных значениях рН методами флуоресцентного анализа по изучению неполяризованной собственной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина. Бычий сывороточный альбумин (БСА) имеет в своей аминокислотной цепи два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

Получены спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (БСА) в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН.

На рис. 3.1 и рис. 3.2, в качестве примеров, представлены спектры триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с различными концентрациями ДСН при рН 4,5 и рН 7,5 соответственно. В растворах с ДСН происходит тушение триптофановой флуоресценции бычьего альбумина, имеющее место при всех значениях рН.

Характер изменений спектров триптофановой флуоресценции бычьего альбумина при увеличении концентраций ДСН в растворах различался для значений рН 3,5 – 4,5, меньших изоэлектрической точки БСА (рI 4,9), и для значений рН 5,0 – 8,0, больших рI БСА (4,9).

На рис. 3.3 изображены зависимости интенсивности в максимуме спектров триптофановой флуоресценции БСА ( $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ ) от концентрации ДСН для различных значений рН. В растворах, содержащих ДСН, триптофановая флуоресценция БСА тушится. Тушение триптофановой флуоресценции БСА в присутствии ДСН объясняется его денатурацией, вследствие которой при разворачивании глобулы хромофорные группы триптофановых остатков БСА

становятся более доступными для молекул воды, тушащих их флуоресцентное свечение.

Из рис. 3.4 видно, что более сильное тушение собственной триптофановой флуоресценции БСА в присутствии ДСН при одинаковых концентрациях ДСН наблюдается при более низких значениях рН. Обнаружена следующая закономерность тушения флуоресценции БСА в растворах, содержащих ДСН, от рН: чем выше рН, тем меньше тушение флуоресценции БСА.

Данная закономерность говорит об электростатическом механизме взаимодействия БСА с ДСН. Молекулы ДСН в растворе распадаются на положительно заряженные ионы натрия и додецилсульфат-анионы, и именно додецилсульфат-анионы взаимодействуют с БСА (в работе исследованы концентрации ДСН, меньшие его ККМ).

При  $\text{pH} < \text{pI}$  БСА молекулы БСА в целом заряжены положительно. Поэтому в растворах, содержащих ДСН, при низких значениях рН происходит интенсивное связывание в целом положительно заряженных макромолекул БСА с додецилсульфат-анионами, вследствие чего наблюдается сильное тушение триптофановой флуоресценции БСА в растворах с ДСН по сравнению с растворами, не содержащими ДСН.

По мере увеличения рН в целом положительный заряд макромолекулы БСА уменьшается, а при  $\text{pH} > \text{pI}$  молекулы БСА приобретают в целом отрицательный заряд. Поэтому при  $\text{pH} > \text{pI}$  БСА происходит слабое связывание додецилсульфат-анионов и в целом отрицательно заряженных молекул БСА, хотя еще и сохраняющих некоторые положительно заряженные участки, вследствие чего в растворах, содержащих ДСН, наблюдается слабое тушение триптофановой флуоресценции БСА.

Следовательно, более сильная денатурация БСА под действием ДСН происходит при рН, меньших  $\text{pI}$  БСА.

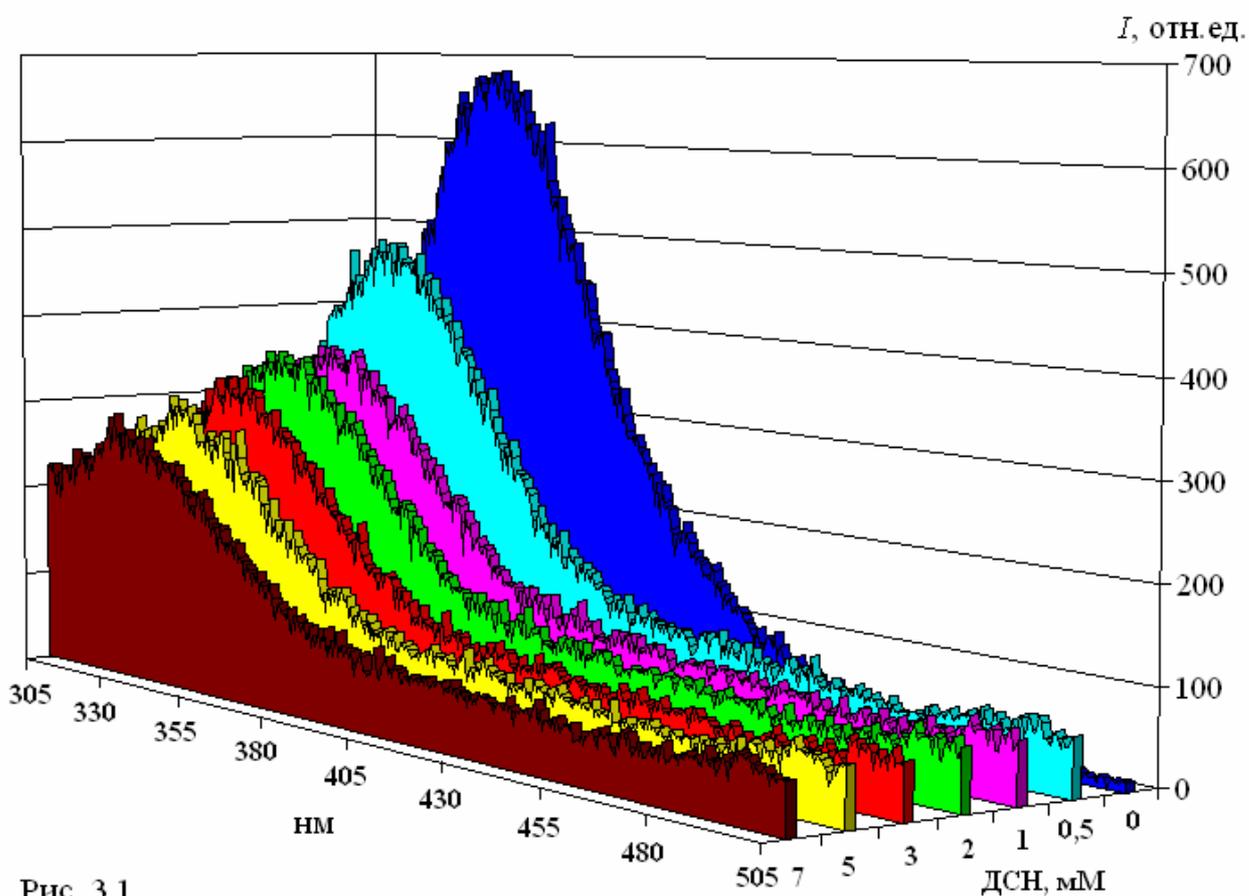


Рис. 3.1.

Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями ДСН при рН 4,5.

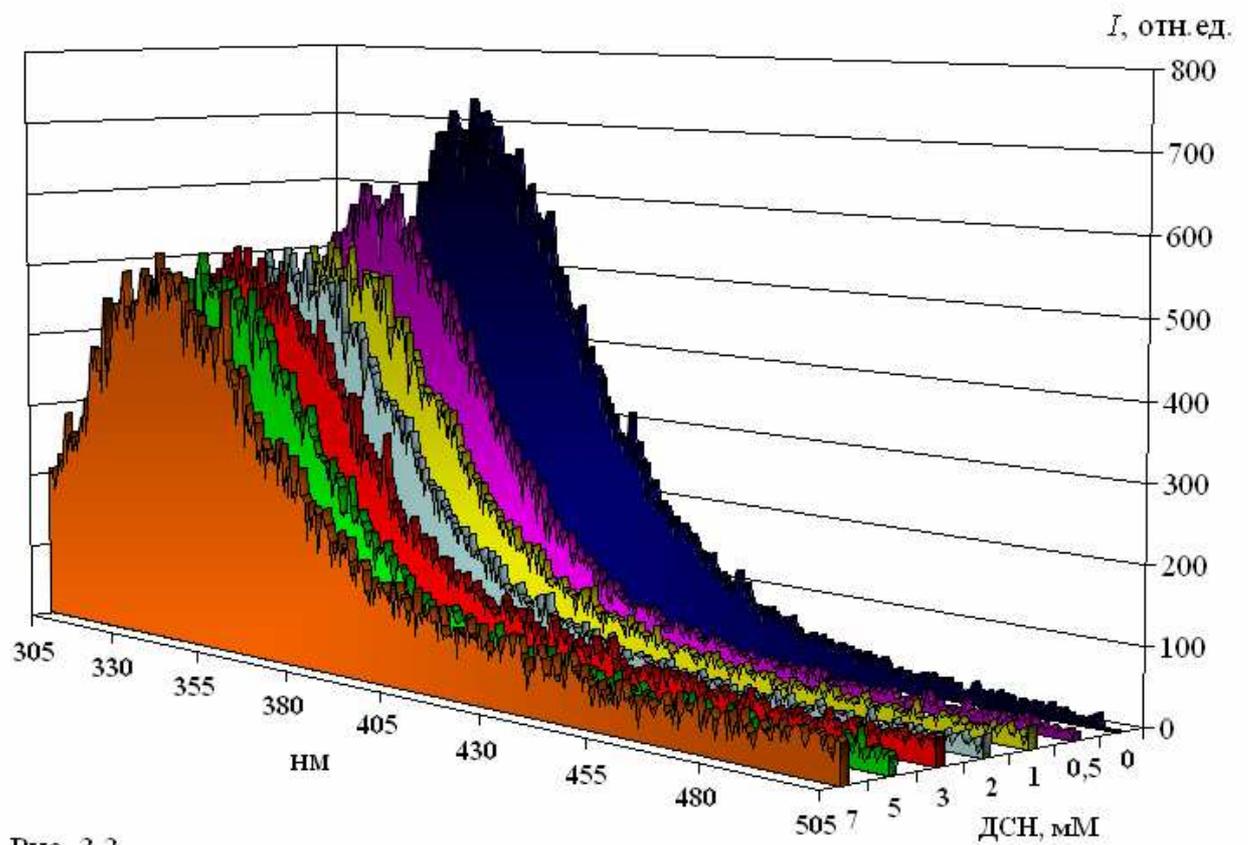


Рис. 3.2.

Спектры триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с различными концентрациями ДСН при рН 7,5.

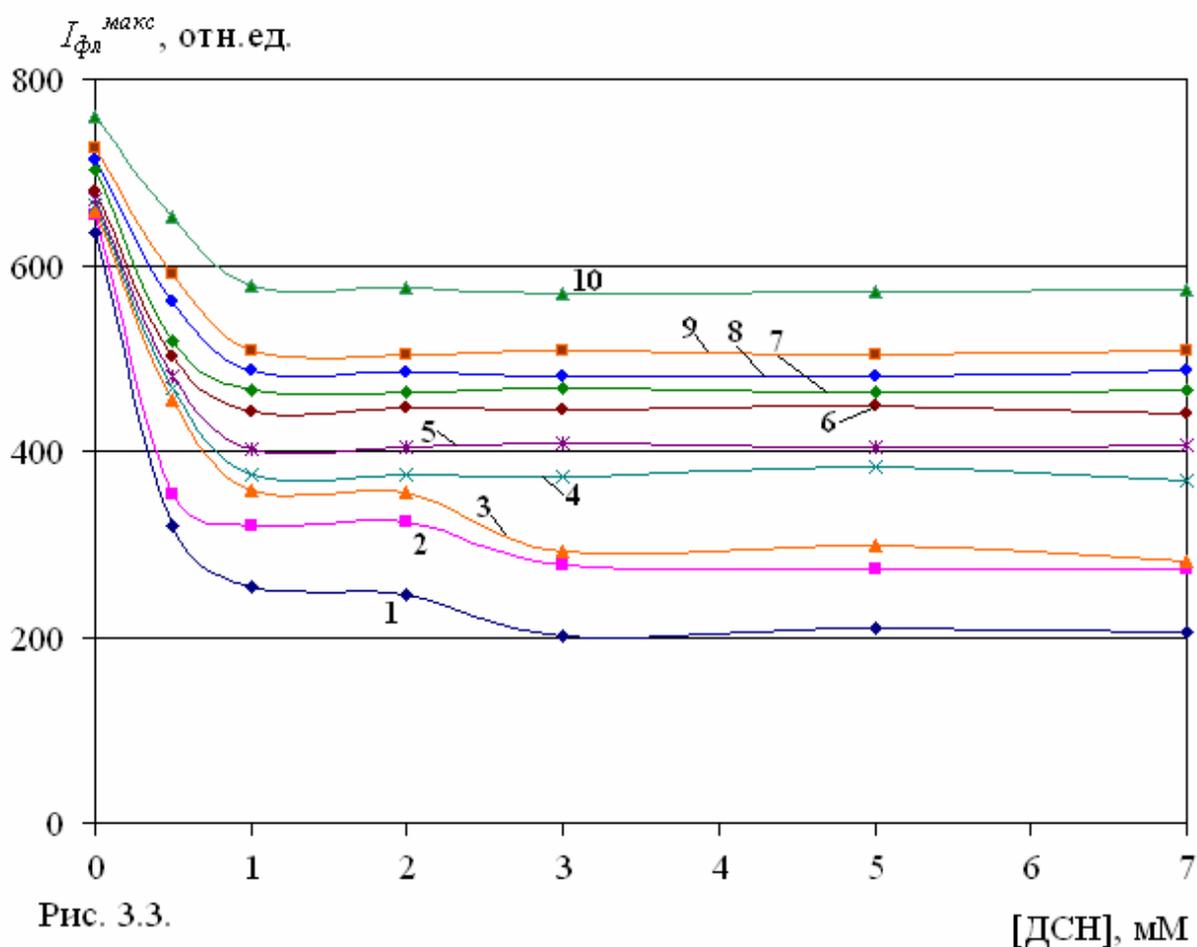


Рис. 3.3.

[DCH], mM

Интенсивность в максимуме спектра триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с ДСН 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).

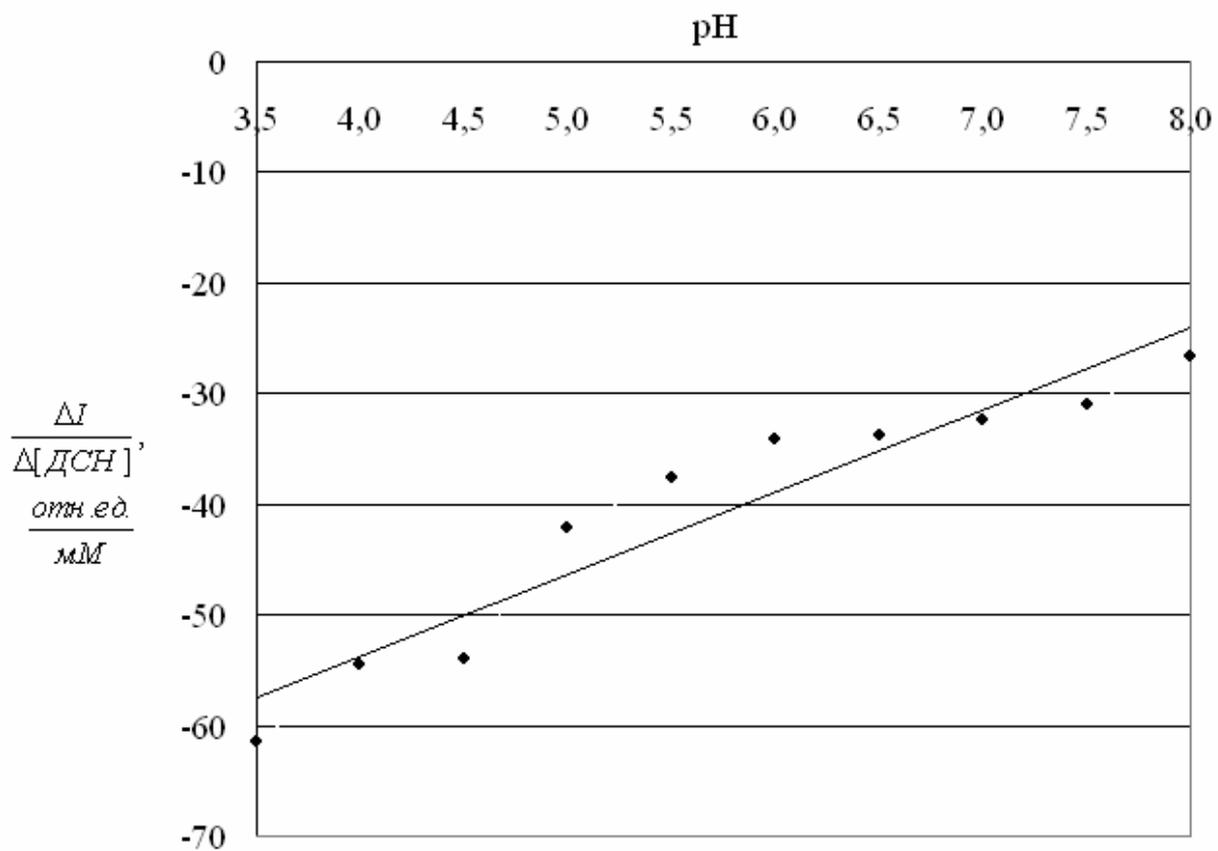
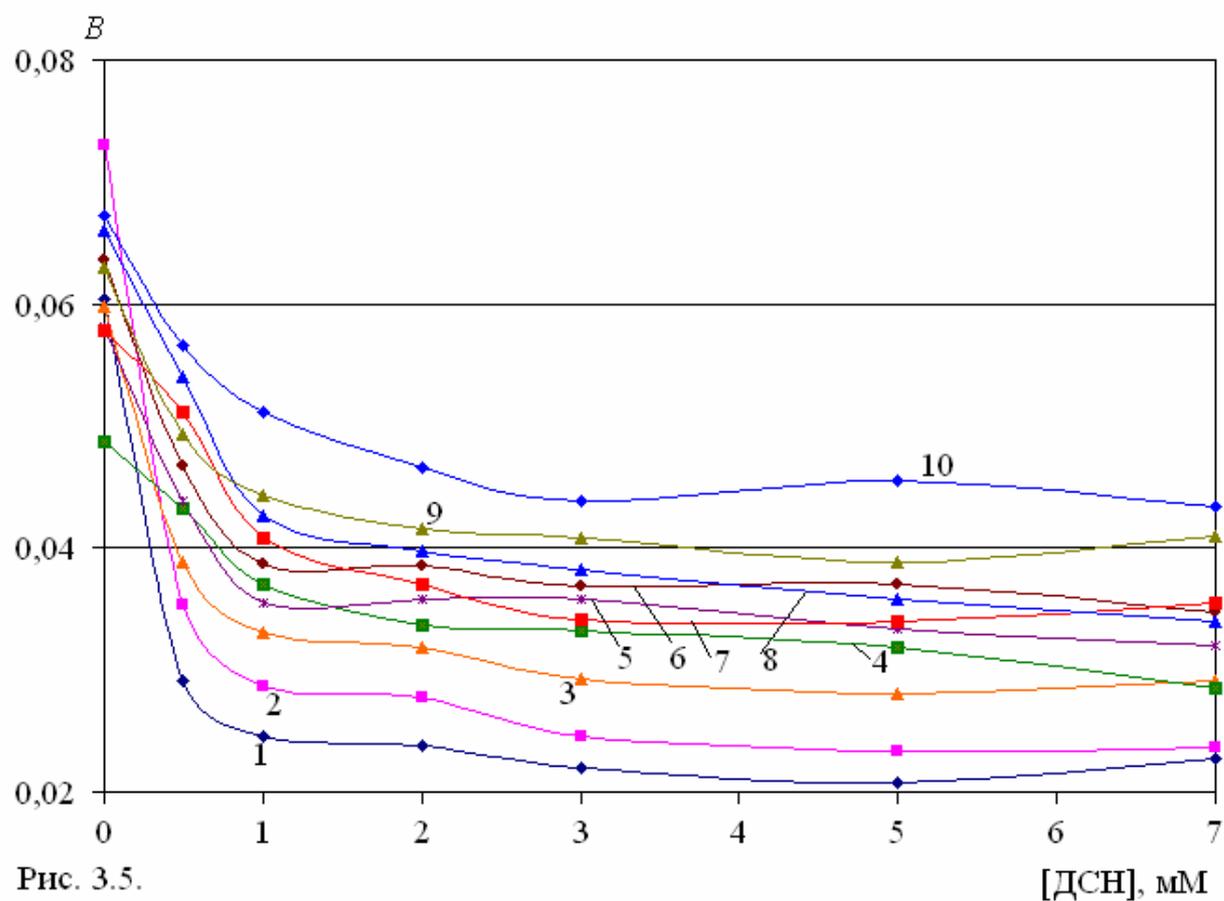


Рис. 3.4. Среднее изменение триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина к изменению концентрации ДСН в растворах с различными значениями рН.



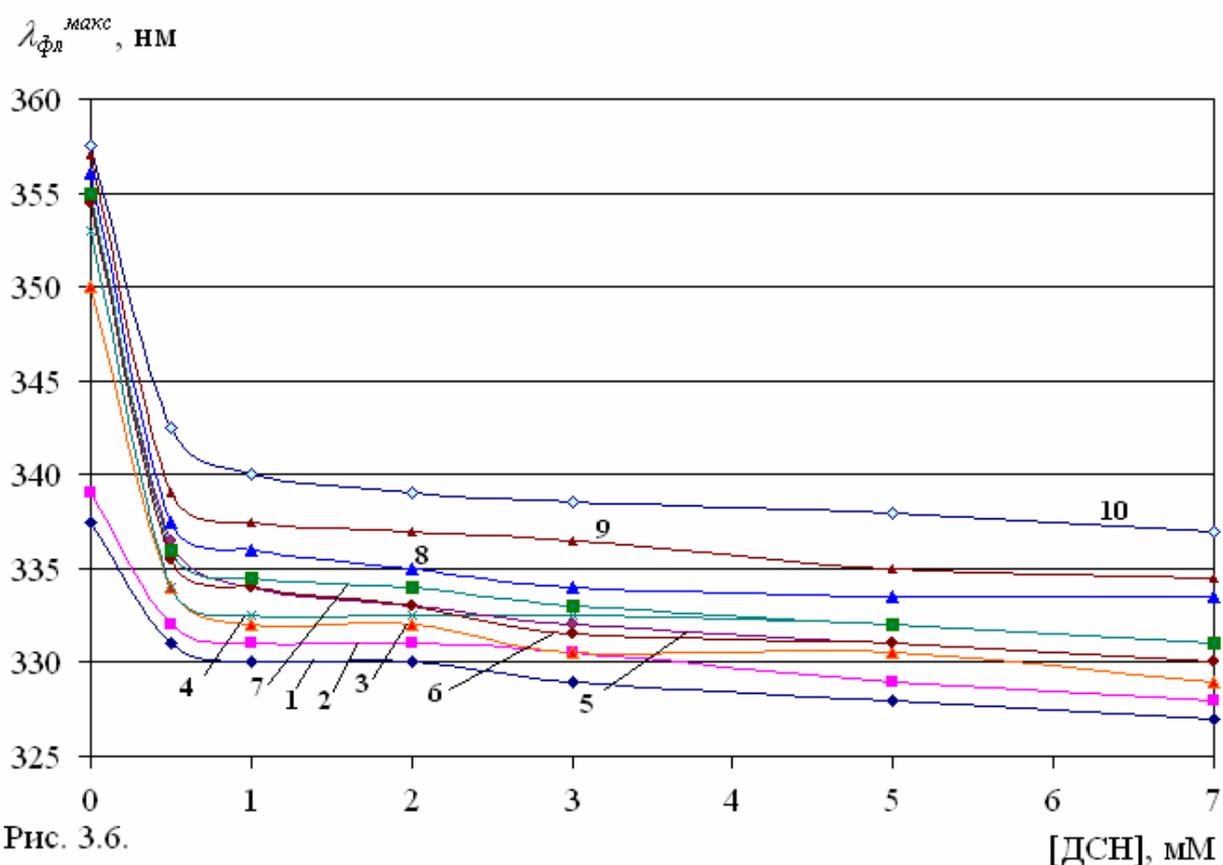


Рис. 3.6.

Длина волны в максимуме спектра триптофановой флуоресценции (возбуждение 295 нм) бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах с ДСН 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).

Установленные экспериментальные при различных значениях рН зависимости  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  от концентрации ДСН (рис. 3.3) можно объяснить стадийным механизмом денатурации БСА в присутствии ДСН. При этом характер зависимостей  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  от концентрации ДСН зависит от того, выше или ниже рI БСА находится рН.

При значениях рН 3,5 – 4,5, меньших рI БСА (4,9), денатурация БСА в присутствии ДСН представляет собой не непрерывный одностадийный процесс, а ступенчато – двустадийный. При концентрациях ДСН, меньших 1 мМ, наблюдается тушение триптофановой флуоресценции альбумина, затем в области концентраций ДСН от 1 до 2 мМ значение  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  практически постоянно. При концентрациях ДСН до 2 мМ протекает первая переходная стадия денатурации белка: белковые глобулы БСА разрыхляются, но полного их разворачивания еще не происходит. При увеличении концентрации ДСН до 3 мМ наблюдается дальнейшее тушение триптофановой флуоресценции БСА, что указывает на переход белковых молекул из состояния разрыхленности во вторую стадию денатурации – стадию полного разворачивания. При увеличении концентрации ДСН от 3 до 7 мМ усиления тушения триптофановой флуоресценции альбумина не наблюдается,  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  меняется незначительно, что указывает на полную денатурацию молекул БСА. Двухэтапное тушение собственной флуоресценции БСА при возрастании концентрации ДСН при значениях рН, меньших рI белка, объясняется двустадийным механизмом его денатурации и последовательными конформационными перестройками белковой глобулы, приводящими к оголению триптофанов и увеличению их доступности для молекул воды, тушащих их флуоресценцию.

При значениях рН 5,0 – 8,0, больших рI БСА (4,9), додецилсульфат-анионы плохо связываются с белковыми молекулами, которые в целом заряжены отрицательно, хотя некоторые положительно заряженные участки на белковых молекулах еще остаются, и именно с ними и связываются додецилсульфат-анионы. При этих значениях рН денатурация БСА под

действием ДСН идет слабо. Судя по форме кривых (рис. 3.3), двустадийный процесс денатурации БСА в присутствии ДСН при этих значениях рН проходит только первую стадию. При увеличении концентрации ДСН до 1–2 мМ происходит тушение триптофановой флуоресценции альбумина, т.е. наблюдается денатурационное разрыхление белковых глобул (первая стадия денатурации), приводящее к увеличению доступности триптофанов БСА для тушащих их флуоресценцию молекул воды. Дальнейший рост концентрации ДСН ( $> 2$  мМ) при этих значениях рН не приводит ко второй стадии денатурации, поскольку  $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  остается практически постоянной.

Таким образом, в отличие от денатурации при  $\text{pH} < \text{pI}$  белка, проходящей две стадии (разрыхление и полное разворачивание), при  $\text{pH} > \text{pI}$  денатурация БСА в интервале исследованных концентраций ДСН останавливается на первой стадии разрыхления белковых глобул.

На рис. 3.5 изображены зависимости квантового выхода триптофановой флуоресценции БСА ( $I_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ ) от концентрации ДСН для различных значений рН. Видно, что данные зависимости носят характер аналогичный характеру зависимостей интенсивности триптофановой флуоресценции БСА от концентрации ДСН, представленной на рис. 3.3.

Механизм денатурации БСА под действием ДСН исследован также по анализу положения  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ . На рис. 3.6 представлены зависимости положения максимума спектра триптофановой флуоресценции БСА  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  при различных значениях рН от концентрации ДСН. При добавлении в раствор первой концентрации ДСН (0,5 мМ) происходит резкий синий сдвиг  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$ . Добавление дальнейших увеличивающихся концентраций ДСН (от 0,5 мМ до 7,0 мМ) приводит к уже небольшому синему сдвигу спектров триптофановой флуоресценции БСА. Синий сдвиг  $\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}}$  в растворах с ДСН объясняется изменением ближайшего окружения хромофорных групп триптофанов БСА вследствие денатурационной перестройки глобулы белка и влияния связавшихся с белком додецилсульфат – анионов.

## **Глава 4. Исследование поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с анионным детергентом ДСН (собственные результаты и их обсуждение)**

### ***§4.1. Исследование поляризованной триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах ДСН с различными значениями рН***

Также в работе проведены исследования поляризованной триптофановой флуоресценции БСА. Получены зависимости степени поляризации и степени анизотропии триптофановой флуоресценции БСА от концентрации ДСН для различных значений рН (рис. 4.1 и рис. 4.2 соответственно). Значения  $P$  и  $r$  рассчитывались по значениям  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  в максимуме спектров испускания флуоресценции БСА.

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)) вклад от второй причины – безызлучательного переноса энергии между флуорофорами – отсутствует.

Таким образом, при данных экспериментальных условиях на поляризацию флуоресценции триптофанов БСА оказывает влияние только вращательная диффузия флуорофоров – триптофановых остатков молекулы БСА. Эта поляризация флуоресценции триптофановых остатков молекулы БСА в общем случае обусловлена как вращением целой молекулы белка (броуновское диффузионное движение), так и вращением доменов белка с триптофановыми остатками, так и вращением самих хромофоров (триптофанов) относительно своего ближайшего окружения, связанным с дипольно – ориентационной релаксацией хромофоров после возбуждения.

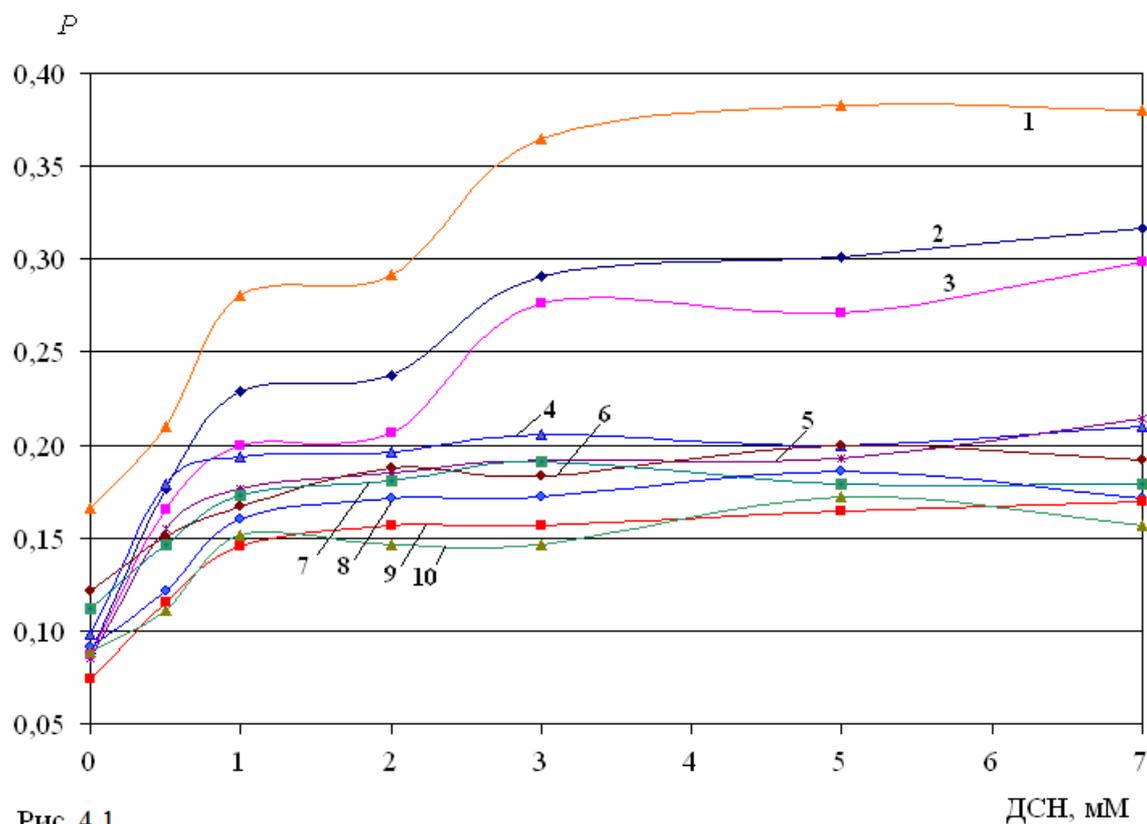


Рис. 4.1.

Степень поляризации триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с ДСН 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).

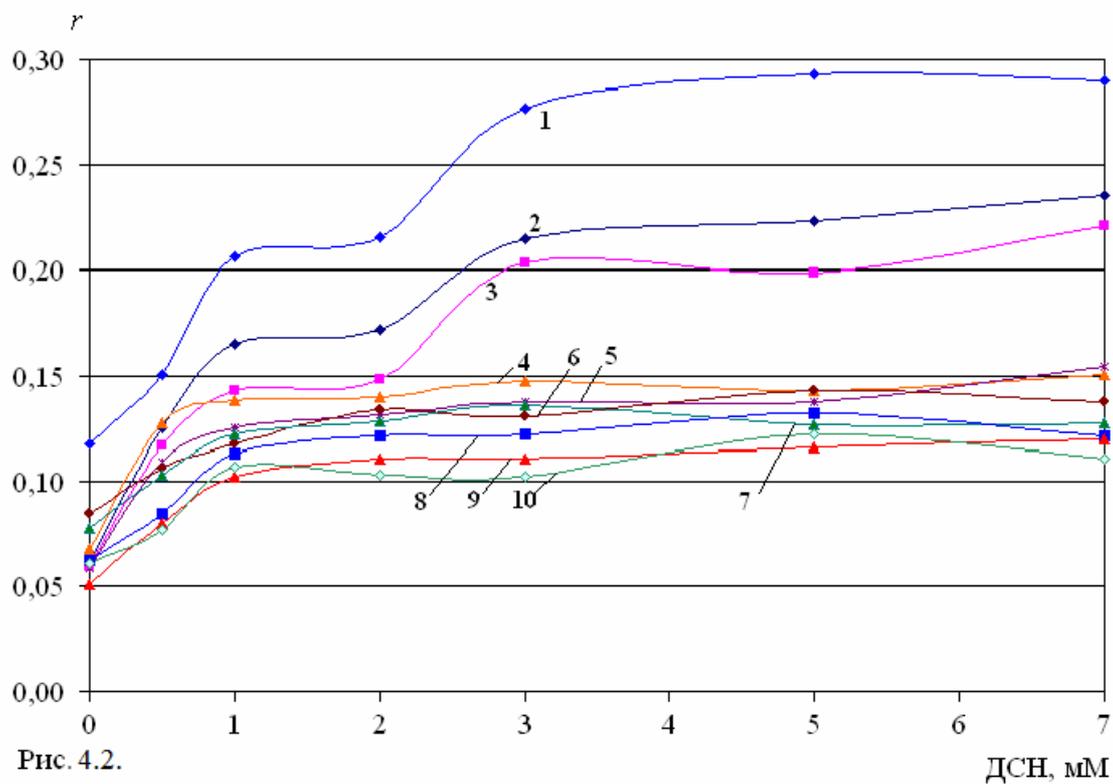


Рис. 4.2.

ДСН, мм

Степень анизотропии триптофановой флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах с ДСН 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).

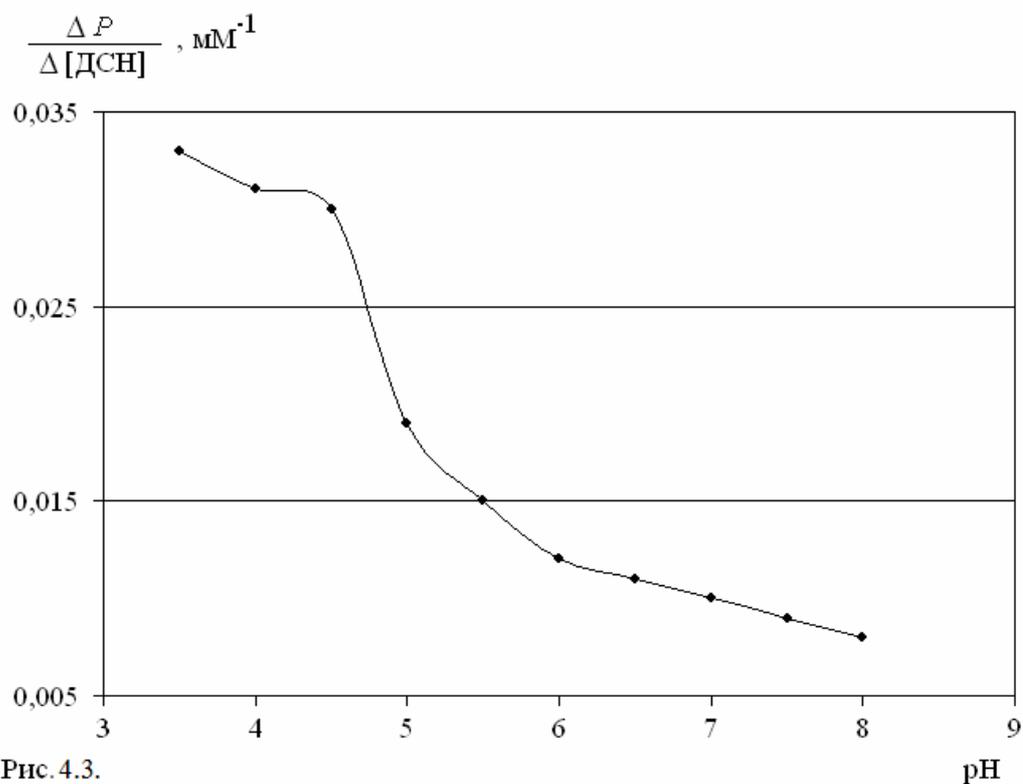


Рис. 4.3. Среднее изменение степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА (5 мкМ) при изменении концентрации ДСН в растворах при различных значениях рН.

Проведенные измерения поляризованной стационарной флуоресценции БСА позволяют анализировать вращение целой молекулы белка, а вклад вращения доменов триптофановых остатков считается пренебрежимо малым.

Как видно из рис. 4.1 и рис. 4.2, значения  $P$  и  $r$  возрастают в области до 1 мМ ДСН для всех значений рН, что указывает на первую стадию денатурации БСА – разрыхление глобул, что приводит к увеличению  $P$  и  $r$ .

Дальнейшее увеличение (больше 1 мМ) концентрации ДСН при рН, больших рI БСА, не меняет значений  $P$  и  $r$ , что указывает на то, что денатурация останавливается на первой стадии.

Иной характер зависимостей  $P$  и  $r$  от концентрации ДСН наблюдается при рН, меньших рI БСА: в области концентраций ДСН от 1 мМ до 2 мМ значение  $P$  и  $r$  практически постоянно, в области концентраций ДСН от 2 мМ до 4 мМ происходит дальнейшее увеличение  $P$  и  $r$ , что объясняется увеличением линейно-продольных размеров молекул БСА при разворачивании аминокислотной цепи, следовательно, молекулы БСА переходят во вторую стадию денатурации – стадию полного разворачивания. При увеличении концентрации ДСН свыше 4 мМ (до 7 мМ) значения  $P$  и  $r$  практически постоянны, что указывает на полную денатурацию молекул БСА. Следовательно, по двустадийному увеличению значений  $P$  и  $r$  при увеличении концентрации ДСН можно заключить, что при рН, меньших рI БСА, денатурация БСА в присутствии ДСН представляет собой ступенчато – двустадийный процесс.

На рис. 4.3. представлено среднее изменение степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА при изменении концентрации ДСН в растворах с различными значениями рН. Из рис. 4.3 видно, что более сильный рост степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА в присутствии ДСН, а значит, более глубокая денатурация БСА под действием ДСН, наблюдается при более низких значениях рН.

#### **§4.2. Определение параметров вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах ДСН с различными значениями pH**

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,  $\eta$  – вязкость раствора,  $V$  – объем,  $k$  – постоянная Больцмана,  $\tau_0$  – среднее время затухания флуоресценции флуорофора,  $P_0$  – предельная степень поляризации флуоресценции.

Таким образом, меняя вязкость растворов (добавлением различных концентраций сахарозы) и откладывая на оси ординат  $1/P$ , а по оси абсцисс  $T/\eta$ , 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  $\tau_0$  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)  $\xi$  флуорофора по формуле:

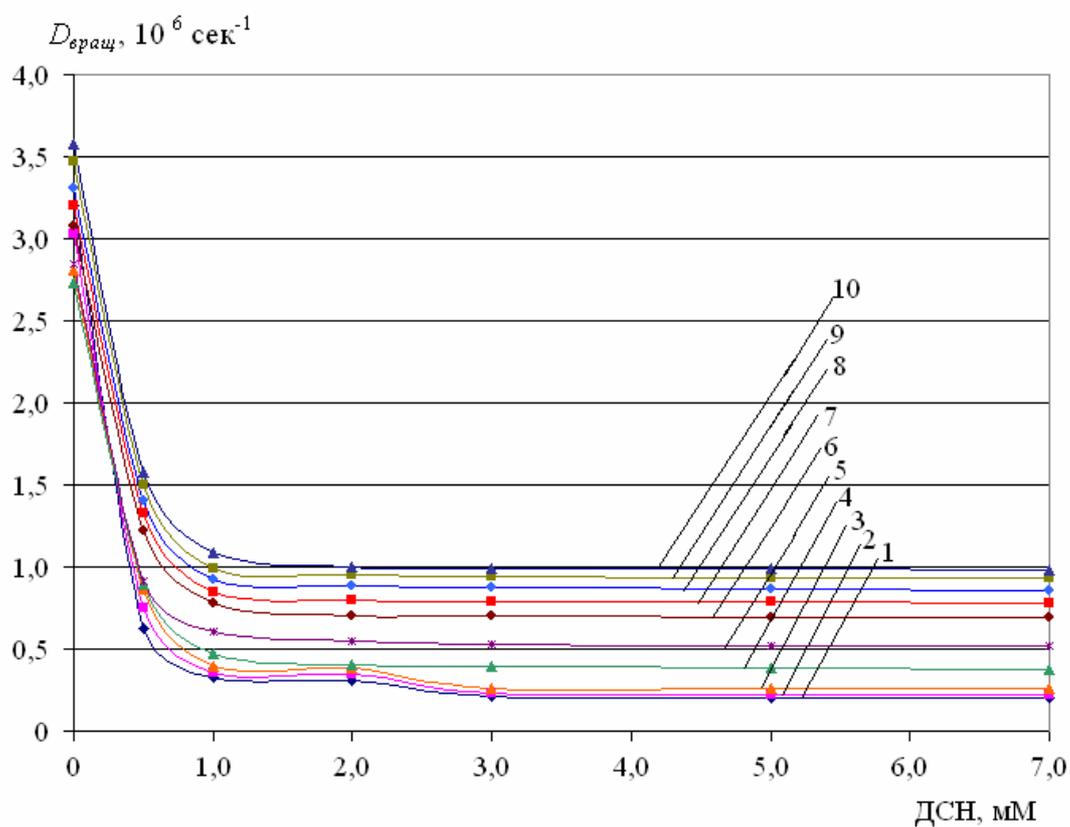


Рис. 4.4 . Коэффициент вращательной диффузии молекул бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

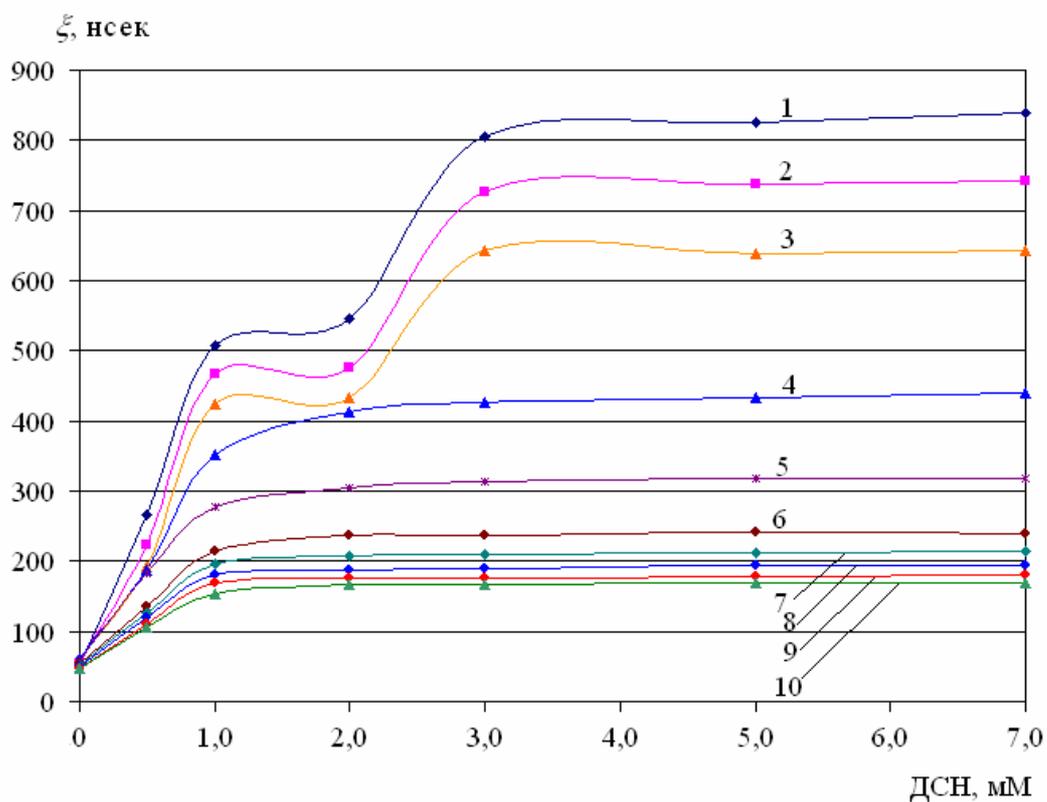


Рис. 4.5 . Время вращательной релаксации молекул бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

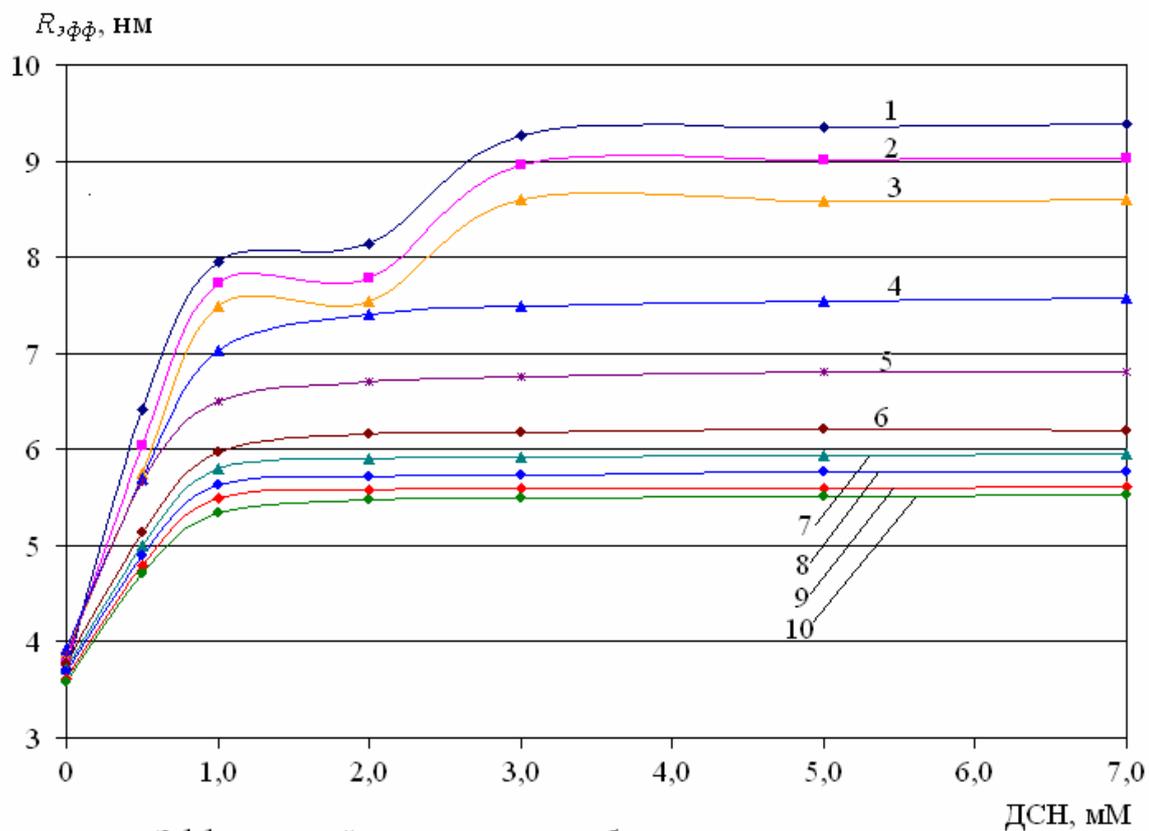


Рис. 4.6 .Эффективный радиус молекул бычьего сывороточного альбумина (5 мкМ) в растворах ДСН при различных значениях рН: 3,5 (1), 4,0 (2), 4,5 (3), 5,0 (4), 5,5 (5), 6,0 (6), 6,5 (7), 7,0 (8), 7,5 (9), 8,0 (10).

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk},$$

где  $V$  – молекулярный объем.

Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии  $D_{rot}$ :

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

Путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус Эйнштейна молекул БСА в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН.

На рис. 4.4 представлены зависимости коэффициента вращательной диффузии  $D_{вращ}$  молекул БСА от концентрации ДСН при различных значениях рН. Видно, что более сильное уменьшение  $D_{вращ}$  молекул БСА в растворах с ДСН происходит при значениях рН, меньших рI БСА, что указывает на глубокую и сильную денатурацию белка.

Также видно, что резкое уменьшение  $D_{вращ}$  молекул БСА происходит при концентрациях ДСН, меньших 0.5 мМ, при всех значениях рН, что указывает на изменение геометрической конфигурации глобул БСА – увеличение линейно-продольных размеров молекул БСА при их разрыхлении вследствие прохождения первой стадии денатурации. Дальнейшее увеличение концентрации ДСН приводит к сравнительно небольшому одностадийному уменьшению  $D_{вращ}$  молекул БСА при значениях рН, больших рI БСА, и к большему двустадийному уменьшению  $D_{вращ}$  молекул БСА при значениях рН, меньших рI БСА.

На рис. 4.5 представлены зависимости времени вращательной релаксации  $\xi$ , отражающей время разупорядочивания вследствие тепловой диффузии, молекул БСА от концентрации ДСН при различных значениях рН. Зарегистрировано, что при всех значениях рН в растворах с ДСН  $\xi$  молекул

БСА существенно больше времени жизни флуорофоров – триптофановых остатков в БСА, что обуславливает высокую поляризацию флуоресценции растворов БСА.

На рис. 4.6 представлены зависимости эффективного радиуса Эйнштейна молекул БСА от концентрации ДСН при различных значениях рН. Радиус молекул БСА, определенный таким образом в сферическом приближении (по уравнению Стокса – Эйнштейна), отражает не реальный геометрический размер молекул БСА, которые при прохождении денатурации под действием ДСН приобретают все более вытянутую, не сферическую геометрическую форму, а показывает эффективный размер молекул БСА, меняющийся под действием ДСН и удобный для оценки степени глубины денатурации белка под действием ДСН.

Видно, что более сильное увеличение размеров молекул БСА имеет место при значениях рН, меньших рI БСА, что говорит о глубокой денатурации белка при этих значениях рН.

При значениях рН, больших рI БСА, увеличение эффективного радиуса молекул БСА происходит одностадийно с увеличением концентрации ДСН, тогда как при значениях рН, меньших рI БСА, увеличение эффективного радиуса молекул БСА происходит двустадийно.

При рассмотрении зависимостей коэффициента вращательной диффузии, времени вращательной релаксации и эффективного радиуса молекул БСА от концентрации ДСН видно, что денатурация БСА под действием ДСН носит стадийный характер.

При значениях рН, меньших рI БСА (4.9), при концентрациях ДСН до 1 – 2 мМ происходит первая стадия денатурации – разрыхление глобул БСА, при концентрациях 3 – 4 мМ ДСН наступает вторая стадия – разворачивание аминокислотной цепи молекул БСА, дальнейшее увеличение концентрации ДСН (больше, чем 4 мМ) ничего не меняет в системе.

При значениях рН, больших рI БСА (4.9), при концентрациях ДСН до 1 – 2 мМ происходит первая стадия денатурации – разрыхление глобул БСА,

дальнейшее увеличение концентрации ДСН не приводит к углублению денатурации.

Следовательно, более глубокая и сильная денатурация БСА под действием ДСН имеет место при значениях рН, меньших рI БСА, что объясняется электростатическими причинами. При значениях рН, меньших рI белка, в целом положительно заряженные молекулы БСА легко связываются с додецилсульфат-анионами, что и объясняет более сильную и глубокую денатурацию при этих значениях рН. При значениях рН, больших рI белка, додецилсульфат-анионы слабо взаимодействуют с в целом отрицательно заряженными молекулами БСА, хотя и сохраняющими на себе какие-то положительно заряженные участки, поэтому денатурация БСА при этих значениях рН под действием ДСН происходит слабее.

## Основные результаты и выводы работы

1. По анализу собственной триптофановой флуоресценции белка (как неполяризованной, так и поляризованной) исследованы денатурационные переходы бычьего сывороточного альбумина БСА, происходящие под действием додецилсульфата натрия ДСН, при различных значениях рН.
2. Исследована интенсивность и положение максимума спектра неполяризованной триптофановой флуоресценции БСА, определены степень поляризации и степень анизотропии поляризованной триптофановой флуоресценции БСА, рассчитаны параметры вращательной диффузии (коэффициент вращательной диффузии, время вращательной релаксации и эффективный гидродинамический радиус) молекул БСА в растворах с различными концентрациями ДСН при различных значениях рН.
3. Поэтапное тушение триптофановой флуоресценции БСА, поэтапное увеличение степени поляризации триптофановой флуоресценции БСА и поэтапное изменение параметров вращательной диффузии (уменьшение коэффициента вращательной диффузии, увеличение времени вращательной релаксации, увеличение эффективного радиуса) молекул БСА при увеличении концентрации ДСН в растворах указывает на стадийный характер денатурации: первая стадия – разрыхление белковых глобул, вторая стадия – полное разворачивание аминокислотной цепи белка. При  $pH < pI$  (изоэлектрической точки) БСА денатурация проходит через обе стадии. При  $pH > pI$  БСА денатурация проходит слабо и останавливается на первой стадии.
4. По анализу триптофановой флуоресценции БСА сделаны выводы, что более эффективная денатурация белка под действием ДСН происходит при  $pH < pI$  БСА, а по мере возрастания рН эффективность денатурации БСА под действием ДСН уменьшается.

## Список цитируемой литературы

1. Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. Люминесценция и ее измерения. Москва, Издательство Московского университета, 1989.
2. Л.В. Левшин, А.М. Салецкий. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. Москва, Издательство Московского университета, 1994.
3. Дж. Лакович. Основы флуоресцентной спектроскопии. Москва, Мир, 1986.
4. Р.И. Досон и др. Справочник биохимика. Москва, Мир, 1991.
5. Л.А. Остерман. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). Москва: Наука, 1981.
6. И.М. Власова, А.М. Салецкий. Поляризованная флуоресценция в исследовании вращательной диффузии альбумина человека при денатурации под действием ДСН. ВМУ, 2011, Серия 3. Физика. Астрономия, №1. с. 58-62.
7. Т.С. Дюбко. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков. «Вестник Харьковского университета. Серия биология», 2006, Вып. 3, № 729, с.221-231.
8. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. Москва, Наука, 1965.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. Bito R., Shikano T., Kawabata H. Isolation and characterization of denatured serum albumin from rats with endotoxycosis. *BBA*, 2003, v. 1646, p. 100-111.
13. 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). *Journal Immunological Methods*, 1996, v. 190, № 1, p. 79-89.
14. 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 Journal Chemistry*, 2004, v. 28, № 1, p. 120-126.
15. О.В. Степаненко, И.М. Кузнецова и др. Структура и стабильность глутаминсвязывающего белка из *Escherichia coli* и его комплекса с глутамином. *Цитология*, 2005, т.47, № 11. с.988-1006.
16. И.М. Власова, А.М. Салецкий. Флуоресценция триптофана при денатурации сывороточного альбумина человека под действием додецилсульфата натрия. *Химическая физика*, 2009, т. 28, № 12, с. 66-71.
17. Т.С. Серченя, О.В. Свиридов. Особенности микроокружения остатков триптофана в третичной структуре альфа-1-микрोगлобулина человека. *Вестник Фонда фундаментальных исследований*, 2010, № 1. с. 6-14.
18. М.Е. Новаковский, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов. Конъюгат биотин-тироксин как бифункциональный лиганд связывающих белков. *Биоорганическая химия*, 2009, т. 35(2), с. 178-191.

19. В.С. Мартынюк, Ю.В. Цейслер, Н.С. Мирошниченко, А.Ю. Артеменко. Влияние магнитного поля крайне низкой частоты на собственную флуоресценцию сывороточного альбумина в условиях его насыщения бензолом. *Физика живого*, 2007, т. 15, № 2, с. 11-17.
20. О.И. Поварова, И. М. Кузнецова, К.К. Туроверов. Физико-химические свойства актина в различных структурных состояниях. Новые представления о процессах его сворачивания - разворачивания. *Цитология*, 2005, т.47, №11, с. 953-977.
21. Ю.Г. Янушевич, Н.Г. Гурская, Д.Б. Староверов и др. Природный флуоресцентный белок, изменяющий цвет флуоресценции в ходе созревания. *Биоорганическая химия*. 2003, т. 29, №4, с. 356-360.
22. Ф.Б. Субач, Е. С. Морозова, В.В. Верхуша, Е.Э. Перский. Спектральные характеристики красных флуоресцентных белков, изменяющих спектр флуоресценции во времени. *Біофізичний вісник*, 2009, вып 22(1), с. 116-122.
23. И.М. Кузнецова, Ольга В. Степаненко, К.К. Туроверов, Ч. Хуанг, Ч.-Ч. Ванг. Конформационные изменения дисульфидизомеразы С под действием гуанидингидрохлорида. *Цитология*, 2005, т.47, №11, с.1007-1016
24. А.А. Маскевич, И.М. Арцукевич, С. А. Маскевич, И.П. Черникевич. Флуоресценция алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей. *Биоорганическая химия*, 1997, т. 23, №6, с. 479-485.
25. А.С. Соболев. Как измеряют подвижность макромолекул в живых клетках. *Соросовский образовательный журнал*, 2000, т.6, №4, с.2-6.
26. С.В. Иванова, Л.Н. Кирпиченок. Флуоресценция, протеолитическая и ингибиторная активность сыворотки крови при хранении и размораживании. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности*, 2010, №1 (3), с. 36-41.
27. Р.К. Айдыралиев , О.А. Игембердиева , Л.Б. Резепкина , Э.А. Чойбекова, Т.Б. Мамытов. Регистрация перекисного окисление липидов в

- липопротеинах низкой и очень низкой плотности с помощью флуоресцентных зондов. Вестник КРСУ, 2008, т. 8, №4, с 3-5.
28. С.Ю. Терещенко, Э.В. Каспаров, О.А. Пахмутова. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов девочек-подростков и молодых женщин при латентном дефиците железа. Фундаментальные исследования, 2009, №4, с. 97-103.
  29. Олеся В. Степаненко, Р.С. Красноруцкая, В.В. Верхуша, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов. Роль остатка в положении 96 в созревании хромофора и стабильности EGFP. Двенадцатая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. 2007. Тезисы докладов. Санкт-Петербург, 42.
  30. А.А. Волгушева, О.В. Яковлева, И.В. Конюхов и др. Изучение параметров флуоресценции хлорофилла *a* хлоропластов коры деревьев тополя, растущих в разных районах города Улан-Батор. МКО-2009, т.2, с. 180-197.
  31. С.В. Трофимова, И.П. Иванова, В.А. Сысоева и др. Влияние излучения низкотемпературной плазмы на уровень флуоресценции тирозина и триптофана эритроцитов интактных крыс с лимфосаркомой Плисса в эксперименте *in vitro*. Сибирский онкологический журнал, 2012. Приложение №1, с. 160-161.
  32. С. Д. Варфоломеев, Е. Н. Ефременко, В. В. Верхуша, П. В. Вржещ. Синтетические аналоги аминокислот в клетках и белках. Вестник Московского Университета, 2000. Серия 2, Химия, т.41, №6, с. 352-354.
  33. А.А. Абрамзон. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение: Учебное пособие для вузов.-Л., Химия, 1988.
  34. А. Ленинджер. Основы биохимии. Том 1. Перевод с английского под редакцией В.А. Энгельгардта. Москва. Мир. 1985.
  35. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2013, V. 14, p. 53–71.

36. Fei Geng, Liqiang Zheng, Li Yu, Ganzuo Li, Chenho Tung. Interaction of bovine serum albumin and long-chain imidazolium ionic liquid measured by fluorescence spectra and surface tension. *Process Biochemistry*, 2010, v. 45, p. 306–311.
37. Jun Zhanga, Lingnan Chenb, Birong Zengb, Qilong Kangb, Lizong Daib. Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV–vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, v. 105, p. 74–79.
38. Rupashree Balia Singh, Subrata Mahanta, Nikhil Guchhait. Destructive and protective action of sodium dodecyl sulphate micelles on the native conformation of Bovine Serum Albumin: A study by extrinsic fluorescence probe 1-hydroxy-2-naphthaldehyde. *Chemical Physics Letters*, 2008, v. 463, p. 183–188.
39. B Ying Xi Wang, Ling Li, Gong Wu Song, Zu Shun Xu. Spectroscopic study on the inherent binding information of cationic perfluorinated surfactant with bovine serum albumin. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2011, v. 132p. 489–494.
40. И. А. Сергеева, Е. А. Ширшин, Н. Г. Жданова, В. В. Гибизова, Г. П. Петрова, С. А. Кургузенков, В. В. Фадеев. Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе. *Оптика и спектроскопия*, 2013, т. 115, с. 201-206.