

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

физический факультет

кафедра общей физики

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

студентки 605 группы

Жерновенковой Светланы Игоревны

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ АССОЦИАЦИЯ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ
НАНОМАРКЕРОВ СЕМЕЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕИНА В РАСТВОРАХ
БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА**

Научный руководитель:

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

аспирантка Кулешова А.А.

Москва-2013

Оглавление

Введение	3
Глава 1. Флуоресцентная и абсорбционная спектроскопия наномаркеров в исследованиях структуры и свойств белков (литературный обзор)	
§1.1. Физические основы электронной спектроскопии: спектры поглощения и спектры флуоресценции.....	5
§1.2. Флуоресцентные наномаркеры (зонды). Свойства наномаркеров семейства флуоресцеина – исходного соединения флуоресцеина и его галоген-производных – эритрозина, эозина, бенгальского розового....	13
§1.3. Флуоресцентная спектроскопия и абсорбционная спектроскопия с применением наномаркеров в исследованиях белковых макромолекул.....	16
Глава 2. Методическая часть экспериментов	
§2.1. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и наномаркеров семейства флуоресцеина.....	25
§2.2. Методика экспериментов для исследования спектров поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина с различными значениями рН.....	25
§2.3. Методика экспериментов для исследования спектров флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина с различными значениями рН.....	25
Глава 3. Исследование спектров поглощения и молекулярной ассоциации наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина (собственные результаты и их обсуждение)	
§3.1. Спектры поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина.....	27
§3.2. Молекулярная ассоциация наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина.....	30
Глава 4. Исследование спектров флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина (собственные результаты и их обсуждение)	36
Основные результаты и выводы работы	48
Список цитируемой литературы	49

Введение

Методы оптики и спектроскопии с применением флуоресцентных наномаркеров (зондов, меток) для исследования биологических систем широко применяются в лабораторных исследованиях и используются в физики, химии, биологии и медицине. На основе этих методов можно распознавать молекулы и различные вещества, получать качественные и количественные характеристики. Одной из важных составляющих этих методов является получение результатов за минимальные сроки без инвазивного воздействия. В частности, с помощью этих методов исследуется строение сывороточных альбуминов (человека и быка), как нативных молекул, так и претерпевших химическую модификацию вследствие внешних воздействий.

Бычий сывороточный альбумин представляет собой небольшой глобулярной белок плазмы крови (молекулярная масса 64 кДа, изоэлектрическая точка pI 4,9). Его концентрация в плазме и сыворотке (35-55 мг/мл) выше, чем концентрация других белков. Молекулы бычьего сывороточного альбумина состоят из одной аминокислотной цепочки из 582 аминокислотных остатков. Третичная структура бычьего сывороточного альбумина определяется тремя доменами, каждый из которых, в свою очередь, подразделяется на два поддомена.

Выбор бычьего сывороточного альбумина в данной работе как модельного белка обусловлен важной ролью этого белка в плазме крови, а именно, альбумин вносит основной вклад во внутрисосудистое коллоидно-осмотическое давление, регулирует вместе с другими белками плазмы pH крови. Кроме того, он является молекулой-переносчиком биологически важных веществ. Альбумин является регулятором гомеостаза на стадии транспорта биологически активных низко- и среднемолекулярных субстанций (лигандов) кровью. Он транспортирует эндогенные физиологически активные вещества (гормоны, витамины, жирные кислоты,

билирубин, лекарственные препараты и другие), а также эндогенные соединения патогенного характера (эндотоксины).

Выделяют несколько главных связывающих центров бычьего сывороточного альбумина, одни из них для связывания малых органических молекул, другие – для длинноцепочечных жирных кислот, лигандов со свободной SH-группой и для связывания ионов металлов.

В настоящее время для исследования связывающих центров сывороточных альбуминов, их физико-химических свойств и структурных свойств используют наномаркеры (зонды) семейства флуоресцеина (флуоресцеин, йодированная производная флуоресцеина – эритрозин, бромированная производная флуоресцеина – эозин, тетра-йод-тетра-хлор-производная флуоресцеина – бенгальский розовый). С их помощью моделируется связывание сывороточного альбумина с рядом лекарственных препаратов для анализа фармакинетики.

Целью данной работы является исследование флуоресцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации четырех наномаркеров семейства флуоресцеина (флуоресцеина, эозина, эритрозина, бенгальского розового) в растворах бычьего сывороточного альбумина.

В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

во-первых, исследовать спектры флуоресценции флуоресцеина, эозина, эритрозина и бенгальского розового в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях pH;

во-вторых, изучить спектры поглощения флуоресцеина, эозина, эритрозина и бенгальского розового в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях pH и определить по ним степень молекулярной ассоциации данных наномаркеров.

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

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

Методы электронной спектроскопии, охватывающие не только ультрафиолетовую область, но и видимую область, связаны с переходами между различными электронными состояниями атомов и молекул. Обычно исследуются абсорбционные спектры (спектры поглощения) и спектры люминесценции [1-3].

Абсорбционная спектроскопия изучает спектры поглощения электромагнитного излучения атомами и молекулами вещества в различных агрегатных состояниях. Интенсивность светового потока при его прохождении через исследуемую среду уменьшается вследствие превращения энергии излучения в различные формы внутренней энергии вещества и (или) в энергию вторичного излучения. Поглощательная способность вещества зависит главным образом от электронного строения атомов и молекул, а также от длины волны и поляризации падающего света, толщины слоя, концентрации вещества, температуры и т.д.

Абсорбционные спектры возникают в результате переходов из основного электронного состояния в возбужденные за счёт поглощения квантов электромагнитного излучения.

Измерение интенсивности в электронных спектрах поглощения вещества в видимой и УФ областях основывается на применении закона Бугера-Ламберта-Бера (рис. 1.1):

$$I_{\lambda} = I_{0\lambda} \exp(-a_{\lambda}cl),$$

где I_{λ} - интенсивность излучения с длиной волны λ , прошедшего через вещество; $I_{0\lambda}$ - интенсивность излучения с той же длиной волны λ , входящего в исследуемое вещество; a_{λ} - коэффициент поглощения для данной длины

волны (л/(моль·см)); c – концентрация вещества (моль/л); l – толщина поглощающего слоя (см).

В логарифмической форме, переходя к десятичным логарифмам получаем выражение:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

где A – оптическая плотность или погашение ($A = \lg(I_0/I)$); ε – коэффициент погашения или экстинкции ($\varepsilon = 0,434a_\lambda$).

Величина, равная отношению интенсивности прошедшего света через образец к интенсивности падающего света, называется пропусканием T : $T = I/I_0$. Следовательно, оптическая плотность связана с пропусканием: $A = \lg(I_0/I)$. Наибольшая точность измерений оптической плотности соответствует интервалу значений от 0,3 до 0,8.

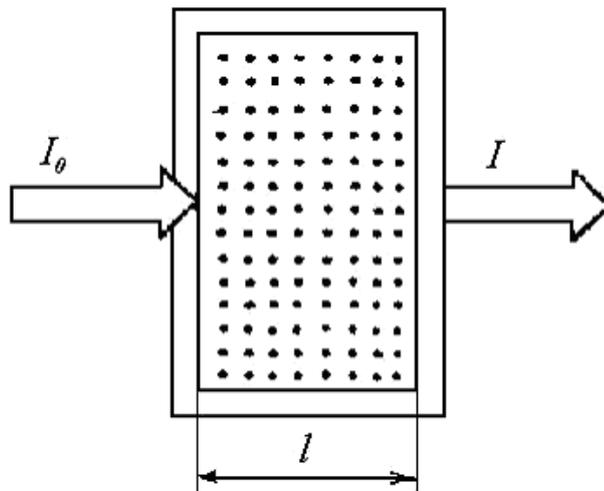


Рис. 1.1. Поглощение света в слое вещества

Спектром поглощения вещества называется зависимость коэффициента экстинкции ε или оптической плотности A от длины волны λ (или волнового числа ν).

Вид спектра поглощения определяется как природой образующих его атомов и молекул, так и агрегатным состоянием вещества. По спектрам поглощения проводят качественный и количественный анализ веществ.

Абсорбционная спектроскопия широко применяют для изучения строения вещества. Она особенно эффективна при исследовании процессов в жидких средах; по изменениям положения, интенсивности и формы полос поглощения судят об изменениях состава и строения поглощающих свет частиц без их выделения из растворов.

С помощью электронной абсорбционной спектроскопии исследуются структурное конформационное состояние и физико-химические свойства макромолекул по собственному поглощению белков в ближней ультрафиолетовой области. В состав белков входит двадцать аминокислот, но лишь три из них, а именно тирозин (Tyr – максимум спектра поглощения на 275 нм), триптофан (Trp – максимум спектра поглощения на 280 нм) и фенилаланин (Phe – максимум спектра поглощения на 258 нм) обладают заметным поглощением в ближней ультрафиолетовой области, а остальные аминокислоты поглощают в дальней ультрафиолетовой области (< 220 нм) (рис. 1.2).

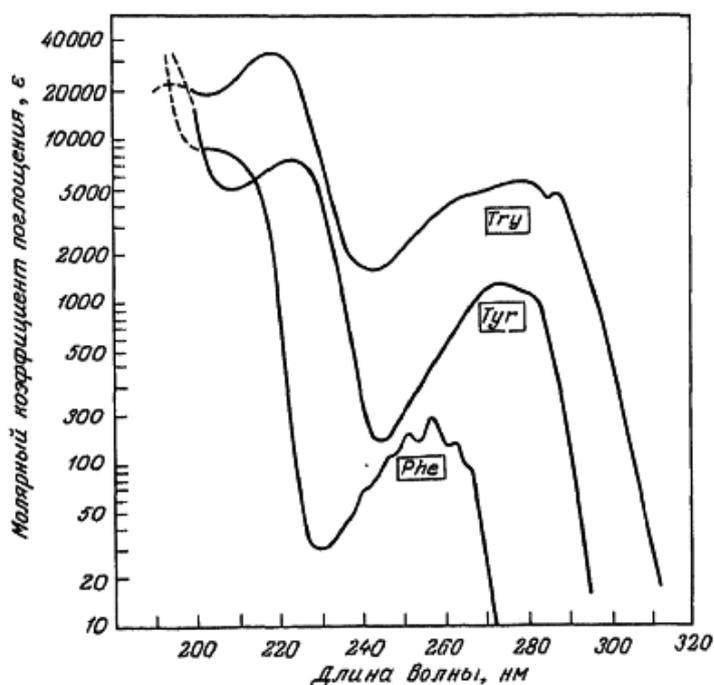


Рис. 1.2. Спектр поглощения триптофана (Trp), тирозина (Tyr) и фенилаланина (Phe) в ультрафиолетовой области.

Структура и свойства белков изучаются не только по собственным спектрам поглощения белков, но и по спектрам поглощения молекулярных зондов и меток (маркеров), связывающихся с белковыми молекулами и чутко реагирующих на изменение своего окружения.

В спектрах поглощения растворов флуоресцентных красителей наблюдается два максимума поглощения – длинноволновый максимум поглощения, соответствующий мономерам красителя, и коротковолновый максимум, характеризующий образование ассоциатов (димеров) красителя. Возникновение ассоциатов существенно изменяет основные оптические свойства раствора, это объясняется наличием сложных межмолекулярных взаимодействий в растворах органических соединений и различной природой сил, объединяющих молекулы в ассоциаты. Существуют две версии образования ассоциатов. Одна – это образование ассоциатов за счет водородной связи. Изменение спектров красителей, свидетельствует о процессах их ассоциации. Эффективность процесса ассоциации зависит от структуры молекул красителей и от природы используемого растворителя. Водородные связи при этом могут образовываться как непосредственно между молекулами красителей, так и при помощи молекул воды, выполняющих роль промежуточных мостиков. Другая точка зрения заключается в том, что объединение молекул красителя в ассоциаты происходит за счет сил Ван-дер-Ваальса. В случае вандерваальсовского взаимодействия диполь-дипольное притяжение молекул приводит к их сближению и, как следствие, объединению в димеры или более сложные ассоциаты.

Показатель поглощения исследуемого раствора α (где $\alpha=A/l$; $\alpha=\varepsilon \cdot c$), если он содержит смесь мономеров и ассоциатов красителя, может быть записан в виде:

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

где α_M , α_A , α - показатели поглощения мономеров, ассоциатов и исследуемого раствора на длине волны λ соответственно, X – доля молекул

красителя, находящихся в растворе в мономерном состоянии, $(1-X)$ – доля ассоциированных молекул красителя в растворе или степень ассоциации раствора.

Содержащаяся в растворе доля молекул красителя в мономерном состоянии определяется выражением:

$$X = (\alpha - \alpha_M) / (\alpha_M - \alpha_A),$$

зная долю молекул красителя в мономерном состоянии в растворе, можно определить и величину степени ассоциации раствора $(1-X)$, которая характеризует, сколько молекул проассоциировало.

Помимо абсорбционной спектроскопии для исследования биологических систем широко применяется люминесцентная спектроскопия. Люминесценция возникает при переходе из возбужденного электронного состояния в основное с испусканием электромагнитного излучения, в этом процессе предусматривается предварительный переход молекул в возбужденное состояние, например облучение вещества, в процессе которого происходит поглощение молекулами квантов света. При этом причиной первоначального их возбуждения могут служить различные факторы: внешнее излучение, температура, химические реакции и др. Если возбуждение происходило за счёт поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения в процессе релаксации носит название фотолюминесценции. Существуют и другие виды люминесценции, такие как электролюминесценция, когда источником энергии возбуждения является электрическое поле, и хемилюминесценция, когда источником энергии возбуждения является энергия химической реакции (ее разновидностью можно считать биолюминесценцию, которая возникает у живых организмов при окислении особых веществ) [1].

В зависимости от природы основного и возбужденного состояния люминесценция делится на два типа (рис. 1.3) – на флуоресценцию и фосфоресценцию.

Флуоресценция наблюдается при переходе с испусканием излучения между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность: обычно между синглетными первым возбужденным и основным состояниями $S_1 \rightarrow S_0$. Флуоресценция характеризуется отсутствием длительного «послесвечения», то есть представляет собой свечение, мгновенно затухающее после прекращения возбуждения ($\sim 10^{-9}$ с).

Фосфоресценция в отличие от флуоресценции, обусловлена оптическими переходами между уровнями разной мультиплетности, обычно нижним возбужденным триплетным и основным синглетным $T_1 \rightarrow S_0$. 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 в отличие от флуоресценции. Фосфоресценция представляет собой свечение, продолжающееся заметный промежуток времени (больше 10^{-6} с) после прекращения возбуждения.

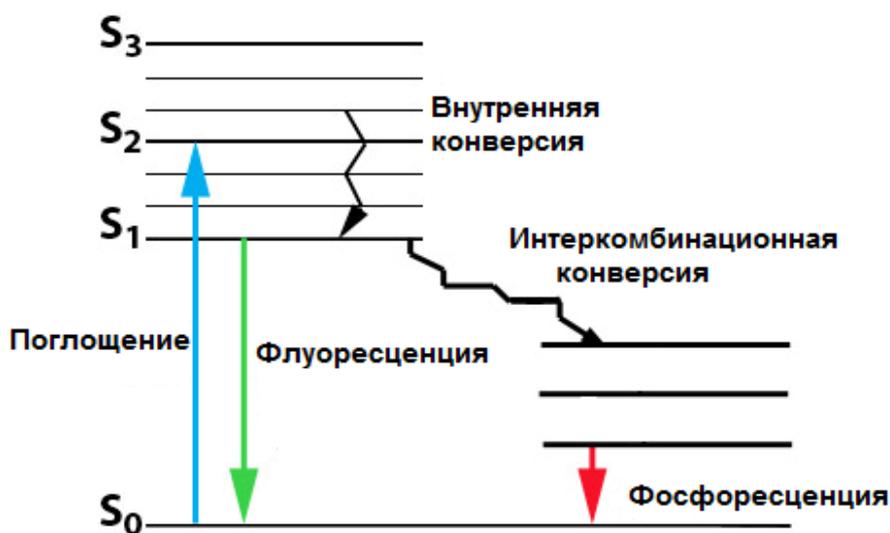


Рис. 1.3. Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы

Фотолуминесценция возникает за счет поглощаемой энергии возбуждающего света, но лишь ее часть превращается в энергию

люминесценции. Эффективность этого процесса характеризуется выходом люминесценции. Различают энергетический и квантовый выходы люминесценции.

Энергетическим выходом люминесценции называют отношение энергии, испускаемой в виде люминесценции E_L , к энергии поглощенного возбуждающего света E_{II}

$$B_{эн} = E_L / E_{II}.$$

Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа испущенных квантов люминесценции N_L к числу поглощенных квантов возбуждающего света N_{II} :

$$B = N_L / N_{II}.$$

Энергетический и квантовый выходы люминесценции связаны между собой соотношением:

$$B_{эн} = B \cdot (\nu_{люм} / \nu_{возб}),$$

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

Выход люминесценции чувствителен к внешним воздействиям, которые могут приводить к тушению свечения. Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. К тушению может приводить множество процессов, в том числе реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии посторонними примесями, температурным воздействием, образование комплексов и тушение при столкновениях [2].

Механизм тушения обычно связан с развитием безызлучательных процессов потери энергии возбуждения: во-первых, за счёт увеличения числа столкновений частиц (динамическое тушение), во-вторых, за счёт образования не люминесцирующих комплексов (статическое тушение). В люминесцентном анализе учёт тушения, влияющего на интенсивность люминесценции, играет важную роль. Тушение флуоресценции флуорофора

добавлением различных концентраций тушителя описывается уравнением Штерна – Фольмера:

$$F_0/F = 1 + K \cdot [Q],$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции хромофора в отсутствие тушителя, F – интенсивность флуоресценции хромофора в присутствии тушителя, $[Q]$ – концентрация тушителя, K – константа тушения флуоресценции хромофора, определяющая связывание хромофора с тушителем (M^{-1}). Прямолинейная зависимость $(F_0/F) - 1$ от $[Q]$ в координатах Штерна - Фольмера обычно указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя.

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

Взаимное расположение спектров поглощения и люминесценции является важной закономерностью молекулярной люминесценции. Спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн, то есть наблюдается потеря энергии. Эта зависимость получила название закона Стокса – Ломмеля, который может быть записан в следующем виде

$$h\nu_{\text{люм}}^{\text{макс}} < h\nu_{\text{погл}}^{\text{макс}}.$$

Обычно спектр испускания флуоресценции представляет собой зеркальное отражение спектра поглощения. Явление приближенной зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции (рис. 1.4) названо по имени его первого исследователя правилом Левшина. Симметричная природа этих спектров определяется тем, что и поглощение, и испускание обусловлены одними и теми же переходами, а так же сходством колебательных энергетических уровней состояний S_0 и S_1 .

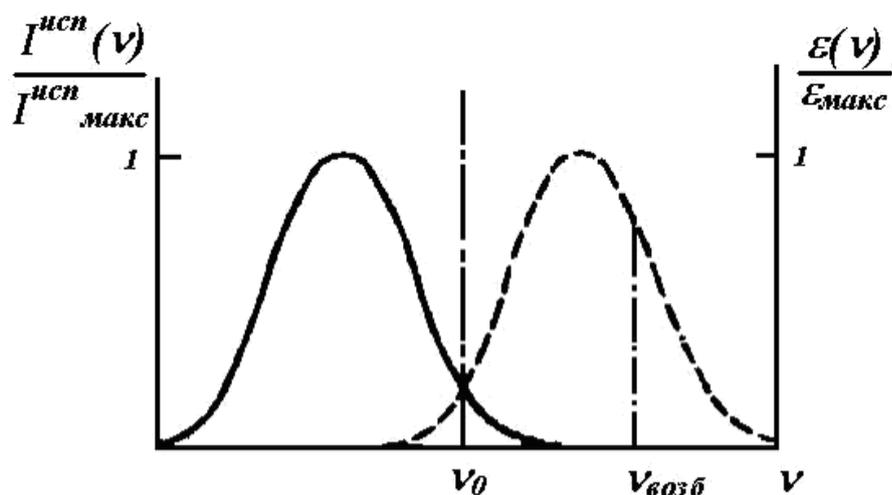


Рис. 1.4. Правило зеркальной симметрии Левшина. Общая схема зеркальной симметрии спектров поглощения (пунктирная линия) и спектров флуоресценции (сплошная линия)

Полного зеркального соответствия никогда не наблюдается, что связано с различиями функций потенциальной энергии в основном и возбужденном электронных состояниях, а также с разной частотной зависимостью интенсивности спонтанного процесса испускания и вынужденного процесса поглощения.

§1.2. Флуоресцентные наномаркеры (зонды). Свойства наномаркеров семейства флуоресцеина – исходного соединения флуоресцеина и его галоген-производных (эритрозина, эозина и бенгальского розового)

Исследование собственной флуоресценции биологических материалов не всегда позволяет получить желаемую информацию об объекте. В таком случае используют искусственные флуорофоры, т.е. специально синтезированные вещества, имеющие специфический спектр флуоресценции либо в свободном состоянии, либо при связывании с тем или иным объектом исследования. Флуоресценция таких веществ (зондов, меток и маркеров), как правило, обладает высоким квантовым выходом и достаточно большим временем жизни [4-6].

Флуоресцентные красители семейства флуоресцеина – исходное соединение флуоресцеин и его галоген-производные (эозин, эритрозин, розовый бенгальский) широко применяются в исследованиях молекулярной организации белковых макромолекул.

Флуоресцеин (рис. 1.5) является исходным соединением этого гомологичного ряда.

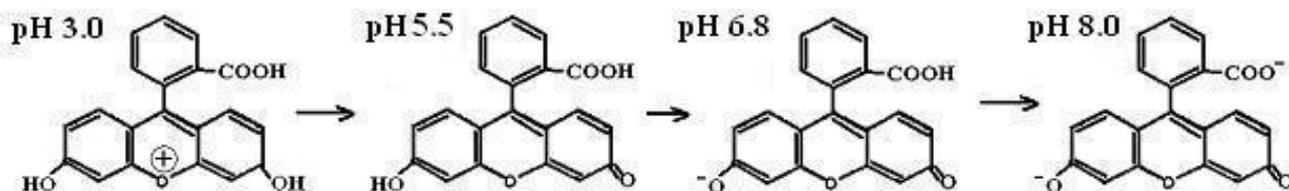


Рис. 1.5. Структурные формулы флуоресцеина и значения рК его ионизируемых групп

рК карбоксильной группы флуоресцеина 8,0, рК гидроксильной группы флуоресцеина 6,8. При рН < 5,5 флуоресцеин слабо положительно заряжен. При рН 5,5 – 6,8 молекулы флуоресцеина электрически нейтральны. При рН 6,8 – 8,0 флуоресцеин слабо отрицательно заряжен (моноанион). При рН > 8,0 флуоресцеин сильно отрицательно заряжен (дианион).

Йодированная-производная флуоресцеина – эритрозин (рис. 1.6).

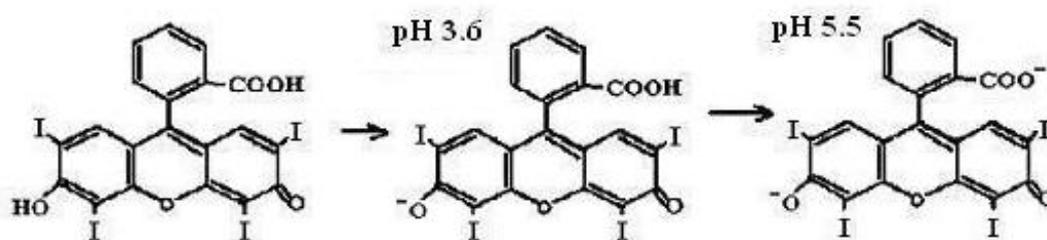


Рис. 1.6. Структурные формулы эритрозина и значения рК его ионизируемых групп

рК карбоксильной группы эритрозина 5,5 и рК гидроксильной группы эритрозина 3,6. При рН < 3,6 молекулы эритрозина электрически нейтральны. При рН 3,6 – 5,5 эритрозин слабо отрицательно заряжен

(моноанион). При $\text{pH} > 5,5$ эритрозин сильно отрицательно заряжен (дианион).

Бромированной-производной флуоресцеина является эозин (рис. 1.7).

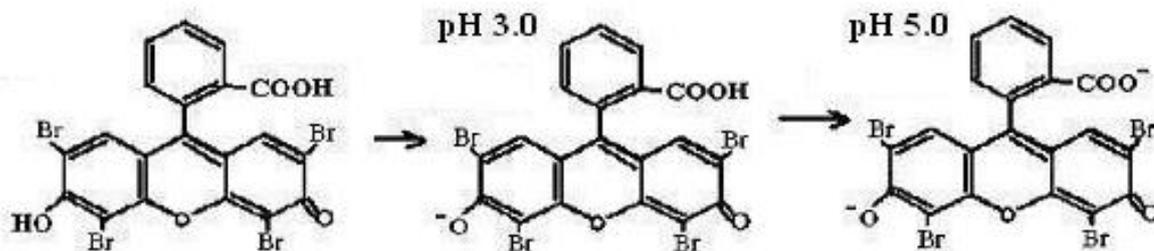


Рис. 1.7. Структурные формулы эозина и значения pK его ионизируемых групп

pK карбоксильной группы эозина 5,0 и pK гидроксильной группы эозина 3,0. При $\text{pH} < 3,0$ молекулы эозина электрически нейтральны. При $\text{pH} 3,0 - 5,0$ эозин слабо отрицательно заряжен (моноанион). При $\text{pH} > 5,0$ эозин сильно отрицательно заряжен (дианион).

Тетра-хлор-тетра-йод-производной флуоресцеина является бенгальский розовый (рис. 1.8).

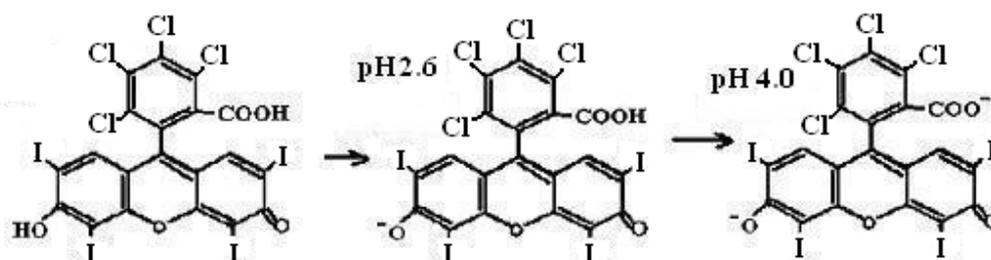


Рис. 1.8. Структурные формулы бенгальского розового и значения pK его ионизируемых групп

pK карбоксильной группы бенгальского розового 4,0 и pK гидроксильной группы бенгальского розового 2,6. При $\text{pH} < 2,6$ молекулы бенгальского розового электрически нейтральны. При $\text{pH} 2,6 - 4,0$ бенгальский розовый слабо отрицательно заряжен (моноанион). При $\text{pH} > 4,0$ бенгальский розовый сильно отрицательно заряжен (дианион).

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

В биологических исследованиях актуально рассмотрение флуоресценции красителей [7-50], которые в качестве флуоресцентных зондов, меток и маркеров, связываются с белками.

В [7] представлены исследования красителя эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина. Флуоресценция эозина при связывании его с белком тушится.

В [8] исследован механизм взаимодействия бычьего сывороточного альбумина с красителем бенгальским розовым. Анализ спектров флуоресценции бенгальского розового в растворах бычьего сывороточного альбумина указывает на динамическое и статическое тушение флуоресценции красителя в растворах белка. Определен радиус переноса энергии электронного возбуждения между маркером бенгальским розовым и бычьим сывороточным альбумином.

Работа [9] посвящена исследованию флуоресценции красителя нильского синего в растворах бычьего сывороточного альбумина. Показана возможность определения количества белка в растворе при рассмотрении величины флуоресценции нильского синего в белковых растворах.

В работе [10] изучалось взаимодействие флуоресцентных красителей К-35 и К7-1045 с белками сыворотки крови крыс методами флуоресцентной спектроскопии. Оценивалось влияние альбумина на спектральные свойства исследуемых флуоресцентных красителей при их связывании с сывороточным альбумином человека в сыворотке крови крыс.

В [11] проведен анализ спектрально-люминесцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации в растворах сывороточного альбумина человека при различных значениях рН флуоресцентных зондов семейства флуоресцеина. При добавлении одного из зондов (флуоресцеина или его галоген - производных) в раствор сывороточного альбумина человека

наблюдаются тушение, красный сдвиг максимума флуоресценции и уменьшение степени ассоциации зондов.

Работа [12] посвящена определению эффективных констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека при различных значениях pH. Введение галогенных групп в структурную формулу флуоресцеина меняет характер зависимости эффективной константы связывания наномаркера с сывороточным альбумином человека от pH. Для флуоресцеина свойственна нелинейная зависимость эффективной константы связывания его с белком, а для эозина и эритрозина характерна монотонно убывающая с ростом pH зависимость эффективной константы связывания их с альбумином человека.

Авторами статьи [13] были охарактеризованы основные группы известных к настоящему времени GFP-подобных белков, описаны их структуры, механизмы сворачивания и образования хромофора, показаны основные направления их использования в качестве флуоресцентных маркеров и сенсоров в клеточной и молекулярной биологии. Зеленый флуоресцентный белок (GFP) из медузы *Aequorea Victoria* стал одним из наиболее пристально изучаемых и широко используемых в клеточной биологии белков. К настоящему времени удалось обнаружить другие природные цветные белки, подобные GFP, и получить мутантные рекомбинантные GFP-подобные белки, отличающиеся от белков дикого типа стабильностью, величиной квантового выхода, положением спектров поглощения, спектров возбуждения флуоресценции и спектров испускания флуоресценции и фотохимическими свойствами.

В работе [14] с помощью метода флуоресцентного анализа были представлены результаты исследований денатурации молекул сывороточного альбумина человека под действием различных концентраций детергента цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) при различных значениях pH. Показано, что под действием ЦТАБ денатурация альбумина человека при всех исследованных значениях pH (3,5–8,0) носит одностадийный характер.

Авторы [15] исследовали новые флуоресцентные зонды на основе тозилатов для оценки эффективности процедур озонотерапии и описали их преимущества при определении содержания и конформационного состояния сывороточного альбумина человека и животных (быка, лошади).

В статье [16] при помощи флуоресцентной спектроскопии были исследованы механизмы взаимодействия бычьего сывороточного альбумина (БСА) с родамином В (RB). Наблюдалось тушение флуоресценции БСА при увеличении концентрации RB. Кроме того, увеличение концентрации RB также привело к расщеплению пика флуоресценции. Таким образом, было показано, что не только интенсивность, но и форма и положение максимума спектра флуоресценции зависят от концентрации красителя и белка.

В [17] по спектрам поглощения молекулярных зондов исследуются конформационные перестройки сывороточного альбумина человека при денатурации под действием гуанидингидрохлорида. Используемые в работе молекулярные зонды – акрилодан ($\epsilon_{360} = 12,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) и продан ($\epsilon_{365} = 14,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) – связываются с определенными связывающими центрами на молекуле белка. Исследование спектров поглощения и флуоресценции данных зондов, связывающихся с белком, позволяет оценивать структурное окружение зондов и, следовательно, определить структурные перестройки доменов альбумина при денатурации под действием гуанидингидрохлорида.

Исследование взаимодействия молекул бычьего сывороточного альбумина с мицеллами додецилсульфата натрия, представляющего собой поверхностно-активное вещество, солюбилизующее белковые молекулы и вызывающее их денатурацию, с помощью молекулярного зонда кумарина С-153 представлено в работе [18]. Связывание макромолекул белка с мицеллами додецилсульфата натрия (ДСН) в работе оценено по изменению спектров поглощения и флуоресценции молекулярного зонда С-153. Рассчитаны величины квантового выхода и времени затухания флуоресценции зонда в этих растворах, с помощью которых в работе

исследованы конформационные перестройки молекул бычьего сывороточного альбумина в присутствии мицелл ДСН.

В [19] представлены исследования возможностей использования цианиновых красителей в качестве флуоресцентных зондов в исследованиях белковых макромолекул. Работа [19] посвящена изучению методами электронной абсорбционной спектроскопии связывания катионных и анионных красителей тиакарбоцианинового ряда с молекулами сывороточного альбумина человека.

Работа [20] посвящена обзору флуоресцентных зондов и меток, применяемых в исследованиях белковых макромолекул.

В работе [21] рассматривался процесс связывания скварейновых красителей с молекулами бычьего сывороточного альбумина. Исследование проводилось на скварейновом флуоресцентном зонде NN127.

В [22] представлены исследования синтетического зонда 2,3 – бис {[(2 – гидроксид – 4 – диэтиламино) (фенил) (метилден)] амино} – 2 – бутендинитрила в растворах различных белков. Изучение увеличения интенсивности флуоресценции данного зонда при связывании его с молекулами белков показывает возможность использования данного зонда для определения белка в растворе (даже при нанограммовом содержании белка в растворе).

В статье [25] описываются теоретические исследования диффузии молекулярных зондов в биологических жидкостях и её влияние на спектры флуоресценции.

В [26] получены спектры флуоресценции С-модуля тирозил-тРНК синтетазы. Быстрая конформационная динамика С-модуля в наносекундном временном интервале была определена с помощью тушения флуоресценции С-модуля акриламидом и ионами Cs⁺.

В [27] изучается тушение флуоресценции эритрозина при связывании с бычьим сывороточным альбумином. При добавлении в раствор белка наблюдаются тушение флуоресценции эритрозина и линейная зависимость между величиной тушения флуоресценции и концентрацией белка.

Статья [28] посвящена изучению флуоресценция триптофана при взаимодействии различных белков с нанозондом кинуренином. В качестве белков используются бычий сывороточный альбумин, химотрипсин и субтилизин Карлсберга.

В работе [29] с помощью флуоресцентной спектроскопии проводились анализы тканей живых объектов, в качестве которых использовались мыши, а наномаркером служил IR-820. У объектов окрашивались травмированные ткани, опухоли, и затем были получены данные о структуре изменения их по сравнению с нативными тканями.

С помощью спектрально-люминесцентного анализа в статье [30] по оценке окислительных повреждений компонентов крови после ишемии было показано защитное действие ишемического прекондиционирования на ткани головного мозга при глобальной ишемии. Исследована флуоресценция сыворотки крови и добавленных в нее молекулярных зондов после проведения процедуры ишемии головного мозга с прекондиционированием. Установлено уменьшение липопероксидного свободнорадикального повреждения липопротеинов низкой плотности после проведения ишемии с прекондиционированием.

В работе [31] было исследовано влияние СВЧ-излучения двух частотных диапазонов (2.0 мм и 6.9 дм) на спектры поглощения катионного красителя родамина 6Ж. Обнаружены обратимое уменьшение количества димеров молекул красителя после СВЧ-облучения его водного раствора, а также явление разрушения ассоциатов молекул красителя под воздействием СВЧ-поля.

В [32] производились исследования вращательной диффузии наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека (САЧ). В растворах САЧ степень поляризации флуоресценции, время вращательной релаксации и эффективный радиус Эйнштейна наномаркеров больше, а коэффициент вращательной диффузии наномаркеров меньше, чем в растворах без белка. Выявлено, что увеличение

электроотрицательности атомов в структурных формулах наномаркеров приводит к увеличению степени поляризации их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации.

Исследованы взаимодействия полициклических ароматических углеводов - пирена и антрацена - с сывороточным альбумином человека (САЧ) и плазмой крови человека [33]. Возрастание интенсивности флуоресценции и уменьшение индекса полярности пирена при переходе от водного раствора к буферному раствору с (pH 7,4) САЧ свидетельствует о том, что полициклические ароматические углеводороды локализуются в гидрофобной микрофазе белков. Увеличение интенсивности флуоресценции антрацена и пирена, а также уменьшение индекса полярности пирена при переходе от САЧ к плазме крови связаны с тем, что полициклические ароматические углеводороды могут связываться как с белками, так и с липидами плазмы. При добавлении в плазму крови додецилсульфата натрия (ДСН) в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования, наблюдается возрастания интенсивности флуоресценции и индекса полярности пирена.

В [34] с целью исследования связывающих центров сывороточного альбумина человека (САЧ), в том числе его лекарственных сайтов, и с целью моделирования связывания с САЧ флуоресцентных наномаркеров семейства флуоресцеина проведен анализ связывания данных наномаркеров с САЧ - с помощью трех различных моделей определены константы тушения флуоресценции наномаркеров, являющиеся фактически константами их связывания с САЧ, при различных значениях pH. Обнаружены зависимости констант тушения флуоресценции наномаркеров от pH: для флуоресцеина - нелинейная, для его галогенпроизводных - монотонно убывающие с ростом pH. Показано, что электроотрицательность атомов в структурных формулах наномаркеров семейства флуоресцеина оказывает влияние на значения констант их связывания с САЧ.

Исследование спектрально-флуоресцентных и поляризационных характеристик *Z,Z*-билирубина обсуждается в работе [35]. В качестве возможных причин наблюдаемой зависимости положения максимума спектра флуоресценции от длины волны возбуждения рассматриваются: структурная и спектральная не идентичность хромофоров, образующих молекулу билирубина; конформационная гетерогенность пигмента в растворе; неоднородное ориентационное уширение уровней.

В [36] обнаружено уменьшение степени молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового в растворах при добавлении в них САЧ. Зарегистрировано, что в растворах с САЧ происходят тушение флуоресценции и красный сдвиг максимума спектра флуоресценции наномаркера бенгальского розового. Показано, что зависимость эффективной константы связывания бенгальского розового с САЧ монотонно убывает с ростом pH. Обнаружено, что на значения степени молекулярной ассоциации наномаркера бенгальского розового и на значения эффективных констант связывания его с САЧ оказывает влияние величина электроотрицательности атомов в его структурной формуле и значения pK его ионизируемых групп.

Статья [37] посвящена исследованию флуоресцентных свойств флавонолов (кверцетина, физетина, морина, рутина) с целью изучения возможного взаимодействия с гемоглобином и бычьим сывороточным альбумином (БСА). Обнаружено увеличение интенсивности собственной флуоресценции всех флавонолов, кроме рутина, в присутствии БСА. По изменениям спектров флуоресценции сделано заключение об образовании таутомерных форм при взаимодействии с гемоглобином. Выявлены взаимосвязи между структурой родственных флавонолов и их флуоресцентными свойствами при взаимодействии с белками, определены константы связывания с БСА и гемоглобином.

Статья [38] посвящена исследованию флуоресцентного зонда K-35, который иногда используется как индикатор структурных перестроек в альбумине сыворотки крови человека при патологических процессах.

Работа [39] посвящена исследованию конформации молекул бычьего сывороточного альбумина в растворах по оценке спектров флуоресценции и фосфоресценции эритрозина, добавленного в белковые растворы.

В [40] для исследования структуры сывороточного альбумина человека и динамики его конформационных перестроек при денатурации под действием додецилсульфата натрия (ДСН) используются спектрально-флуоресцентные характеристики эозина, находящегося в растворах белка.

В работе [41] представлены исследования тушения собственной триптофаной флуоресценции бычьего сывороточного альбумина под действием алкилпиридиновых катионов. В работе показано, что тушение собственной флуоресценции БСА зависит от длины алкильной цепи алкилпиридиновых катионов. По полученным спектрам собственной флуоресценции БСА в присутствии алкилпиридиновых катионов рассчитана константа ассоциации белка с данными катионами.

В работе [42] исследовано связывание БСА и нового зонда – FA, который по результатам люминесцентной спектроскопии может быть предложен для изучения взаимодействия лигандов и красителей различной природы с сывороточным альбумином.

Авторами работы [43] были изучены спектральные и временные характеристики новых флуоресцентных зондов 6,12-диметоксииндоло[3,2-b]карбазола, 5,11-диметил-6,12-диметокси-индоло[3,2-b]карбазола и 5,11-дигексил-6,12-ди(гексилокси)индоло[3,2-b]карбазола в органических растворителях и в комплексах с белками и установлено существование нескольких типов центров связывания зондов в белках.

Работа [44] посвящена исследованию процессов взаимодействия полярного и неполярного люминесцентных зондов с альбуминами сыворотки крови человека методами абсорбционной и люминесцентной спектроскопии. Установлено, что зонды – полярный эозин и неполярный антрацен – эффективно связываются с белками.

В [45] спектрально-флуоресцентными методами исследовано нековалентное взаимодействие двух анионных цианиновых красителей с сывороточными альбуминами человека и быка. При взаимодействии с альбуминами наблюдается рост флуоресценции и длинноволновый сдвиг полосы поглощения красителей. Для мезо-метилзамещенного красителя 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-9-метилтиакарбоцианин-бетаина (K1) наблюдается подвижное цис-транс-равновесие: в свободном состоянии краситель находится главным образом в виде цис-изомера, а в комплексе с альбуминами равновесие сдвигается в сторону транс-изомера (этот сдвиг сильнее в случае альбумина человека).

Авторами работы [46] было изучено флуоресцентными методами нековалентное взаимодействие индолиевых скварилиевых красителей и индодикарбоцианинового красителя с сывороточными альбуминами.

В работе [47] выполнены квантово-химические расчеты электронных спектров поглощения и флуоресценции дианионов некоторых флуоронов в вакууме и метаноле, и выявлены перераспределение зарядов, изменение длин связей, углов между связями.

В [48] установлены закономерности кинетики замедленной флуоресценции и фосфоресценции экзогенных флуорофоров в биологических тканях и отличия кинетики замедленной флуоресценции окрашенных эритрозином образцов здоровых и патогенных тканей *in vitro*.

В работе [49] исследовано влияние энергии возбуждения, температуры, pH на квантовый выход и константу тушения Штерна-Фольмера флуоресценции триптофана хлоридом европия (III).

В [50] изучена возможность применения люминесцентно-кинетической зондовой методики для исследования структурных изменений (БСА) при неферментативном термическом гликировании. Было обнаружено, что с возрастанием времени гликирования наблюдались уменьшение интенсивности и длинноволновое смещение максимума флуоресценции зонда – эозина, а также возрастание интенсивности его фосфоресценции.

Глава 2. Методическая часть экспериментов

§2.1. Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина и наномаркеров семейства флуоресцеина

Для исследования флуоресцентных характеристик и процессов молекулярной ассоциации наномаркеров семейства флуоресцеина были приготовлены буферные растворы: 1) 0,1 М $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{KOH}$, pH (3,5 – 5,0) и 2) 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,1 \text{ М NaOH}$, pH (6,0 – 8,0).

На их основе были приготовлены растворы наномаркеров (флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового) различных концентраций, содержащие бычий сывороточный альбумин (150 мкМ), при различных значениях pH (3,5 – 8,0).

§2.2. Методика экспериментов для исследования спектров поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина с различными значениями pH

Исследование спектров поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ) и в растворах без белка с различными значениями pH (3,5 – 8,0) и при разных концентрациях наномаркеров (3 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 50 мкМ) проводились с помощью спектрофотометра Lambda 35 (Perkin Elmer).

Область регистрации спектров поглощения 350 – 700 нм. Образцы при измерении помещались в кювету при комнатной температуре.

§2.3. Методика экспериментов для исследования спектров флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина с различными значениями pH

Исследования спектров флуоресценции наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ) и

в растворах без белка при различных значениях pH (3,5 – 8,0) проводились с помощью спектрофлуориметра LS 55 (Perkin Elmer).

Флуоресценция флуоресцеина (3 мкМ), как в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ), так и в растворах без белка, возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 440$ нм. Флуоресценция флуоресцеина регистрировалась в диапазоне 450 – 700 нм.

Флуоресценция эозина (30 мкМ), как в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ), так и в растворах без белка, возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 520$ нм. Флуоресценция эозина регистрировалась в диапазоне 530 – 700 нм.

Флуоресценция эритрозина (30 мкМ), как в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ), так и в растворах без белка, возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 530$ нм. Флуоресценция эритрозина регистрировалась в диапазоне 540 – 700 нм.

Флуоресценция бенгальского розового (3 мкМ), как в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ), так и в растворах без белка, возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{возб} = 540$ нм. Флуоресценция бенгальского розового регистрировалась в диапазоне 550 – 700 нм.

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

Глава 3. Исследование спектров поглощения и молекулярной ассоциации наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина (собственные результаты и их обсуждение)

§3.1. Спектры поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина

Получены спектры поглощения наномаркеров семейства флуоресцеина как в растворах без белка, так и в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА) при различных значениях рН и при различных концентрациях наномаркеров.

В качестве примера на рис. 3.1 представлены спектры поглощения флуоресцеина (30 мкМ) в растворах (рН 8,0) без белка (а) и с 150 мкМ БСА (б).

В качестве примера на рис. 3.2 представлены спектры поглощения эозина (30 мкМ) в растворах (рН 3,5) без белка (а) и с 150 мкМ БСА (б).

В качестве примера на рис. 3.3 представлены спектры поглощения эритрозина (30 мкМ) в растворах (рН 5,0) без белка (а) и с 150 мкМ БСА (б).

В качестве примера на рис. 3.4 представлены спектры поглощения бенгальского розового (30 мкМ) в растворах (рН 4,0) без белка (а) и с 150 мкМ БСА (б).

Как видно, для всех наномаркеров наблюдается общая закономерность – положение максимума спектра поглощения наномаркера в растворах с белком смещается в красную область по сравнению с растворами без белка.

В полученных спектрах поглощения наномаркеров в растворах, как содержащих БСА, так и не содержащих его, наблюдается наличие двух максимумов поглощения – длинноволнового максимума мономеров и коротковолнового максимума ассоциатов наномаркера.

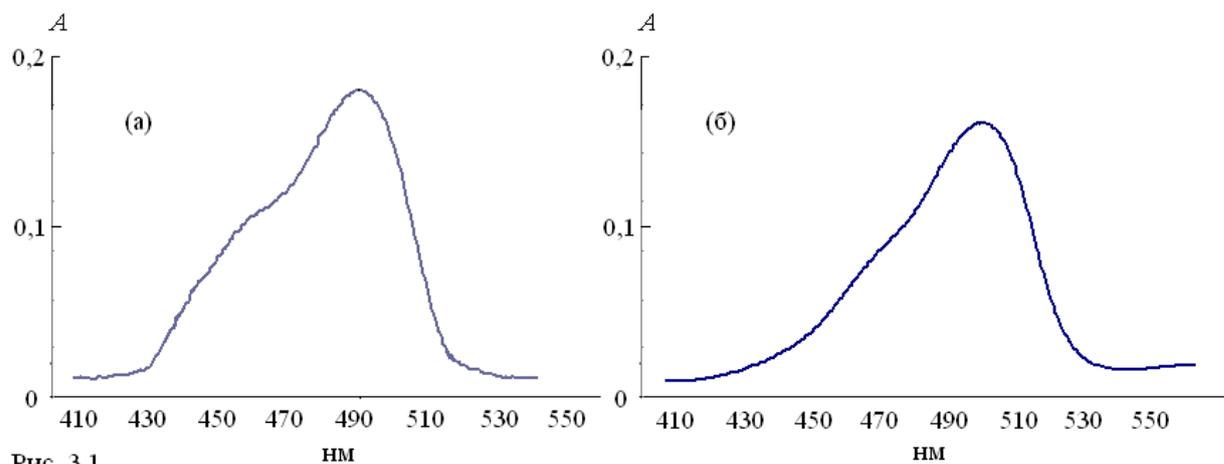


Рис. 3.1.

Спектры поглощения флуоресцина (30 мкМ) в растворах (рН 8,0) без белка (а) и в растворах 150 мкМ бычьего сывороточного альбумина (б).

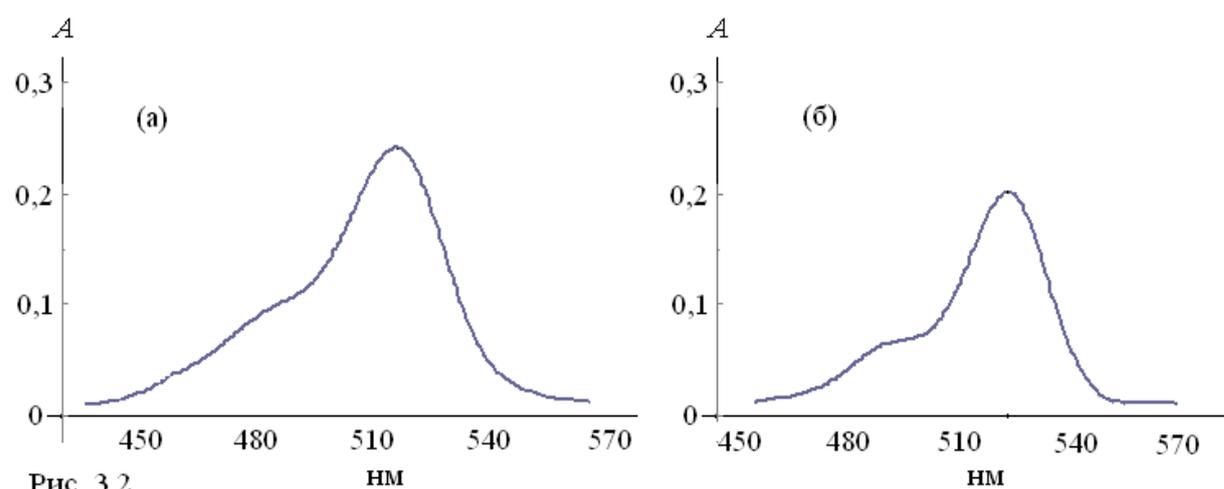


Рис. 3.2.

Спектры поглощения эозина (30 мкМ) в растворах (рН 3,5) без белка (а) и с 150 мкМ бычьим сывороточным альбумином (б).

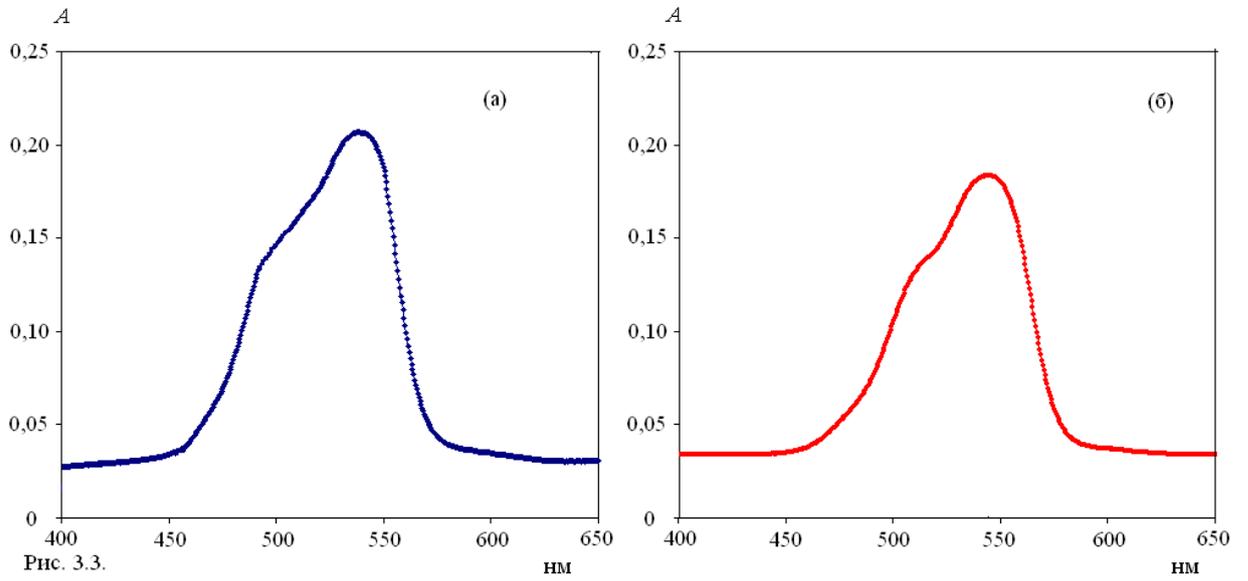


Рис. 3.3.

Спектры поглощения эритрозина (30 мкМ) в растворах (рН 5,0): (а) - без белка, (б) - с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ).

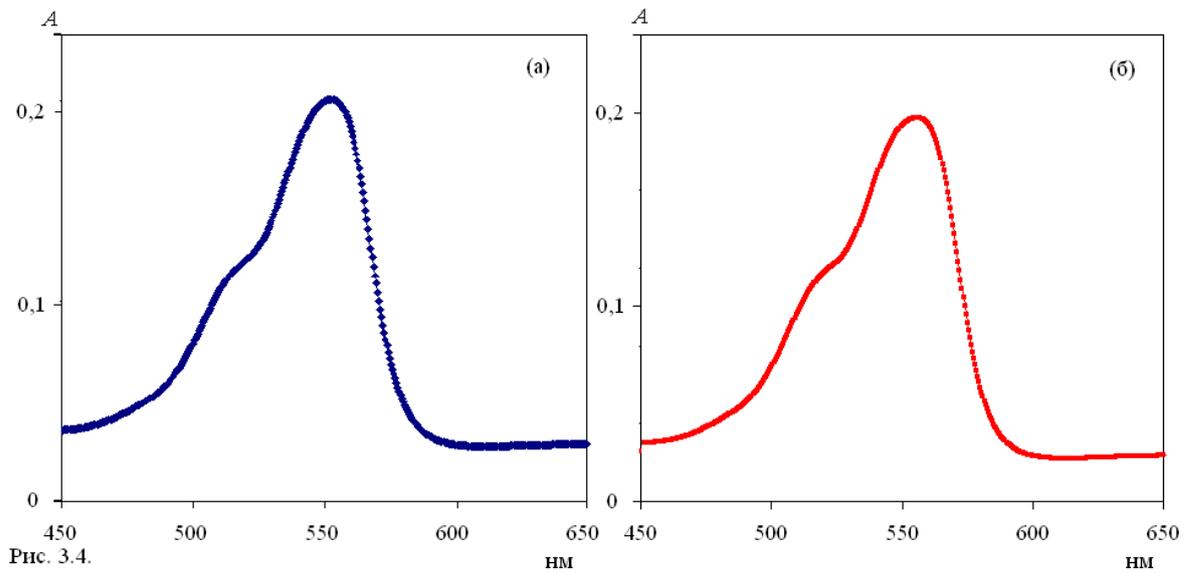


Рис. 3.4.

Спектры поглощения бенгальского розового (30 мкМ) в растворах (рН 4,0): (а) - без белка, (б) - с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ).

§3.2. Молекулярная ассоциация наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина

В работе определена величина степени молекулярной ассоциации наномаркеров как в растворах без белка, так и в растворах с бычьим сывороточным альбумином при различных значениях рН и при различных концентрациях наномаркеров. Величина степени ассоциации ($I-X$) раствора наномаркера представляет собой долю ассоциированных молекул наномаркера ($I-X$) в растворе (где X – доля мономерных молекул).

На рис. 3.5 и рис. 3.6 представлены зависимости $I-X$ молекул флуоресцеина от рН в растворах без белка и с белком соответственно (для различных концентраций флуоресцеина). Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА, зависимость $I-X$ флуоресцеина от рН имеет нелинейный характер с максимумом при значении рН 6,0, при котором молекулы флуоресцеина электрически нейтральны и легко образуют ассоциаты. $I-X$ молекул флуоресцеина в растворах БСА меньше $I-X$ молекул флуоресцеина в растворах без белка при соответствующих значениях рН и концентрациях флуоресцеина, что объясняется связыванием флуоресцеина с белком.

На рис. 3.7 и рис. 3.8 представлены зависимости $I-X$ молекул эозина от рН в растворах без белка и с БСА соответственно при различных концентрациях эозина. При увеличении рН, как в растворах с белком, так и в растворах без белка, наблюдается монотонное уменьшение $I-X$ молекул эозина. При рН $> 5,0$ молекулы эозина в форме дианионов, и их взаимное отталкивание мешает образованию ассоциатов. При $3,0 < \text{pH} < 5,0$ молекулы эозина теряют отрицательный заряд на COOH -группе и переходят в слабо отрицательно заряженную форму моноаниона, что и облегчает их ассоциацию. В растворах бычьего сывороточного альбумина $I-X$ молекул эозина меньше $I-X$ молекул эозина в растворах без белка при соответствующих значениях рН и концентрациях эозина, что объясняется связыванием эозина с молекулами альбумина.

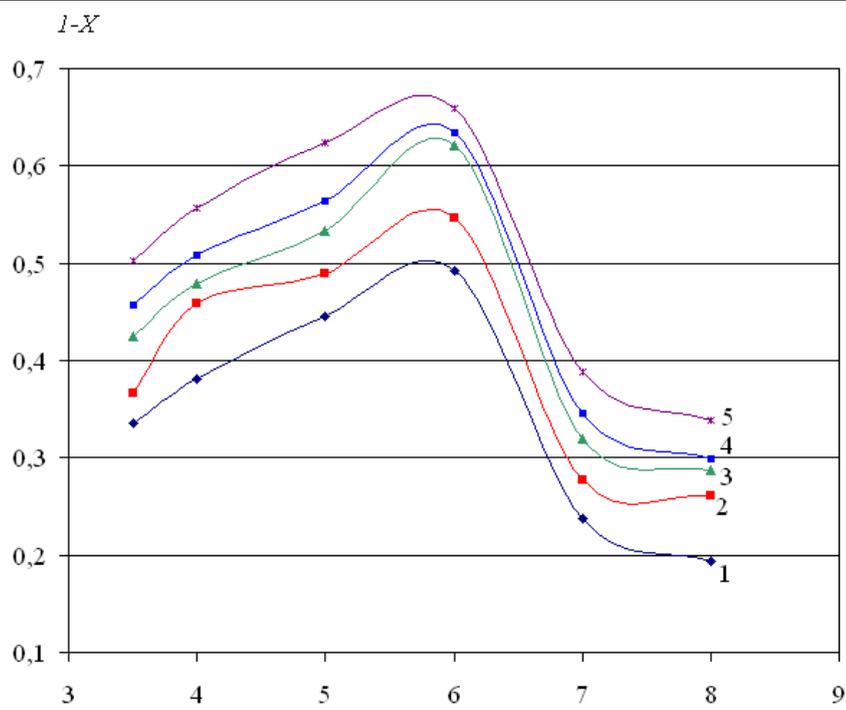


Рис. 3.5. Степень ассоциации флуоресценна в растворах без белка при различных концентрациях флуоресценна: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

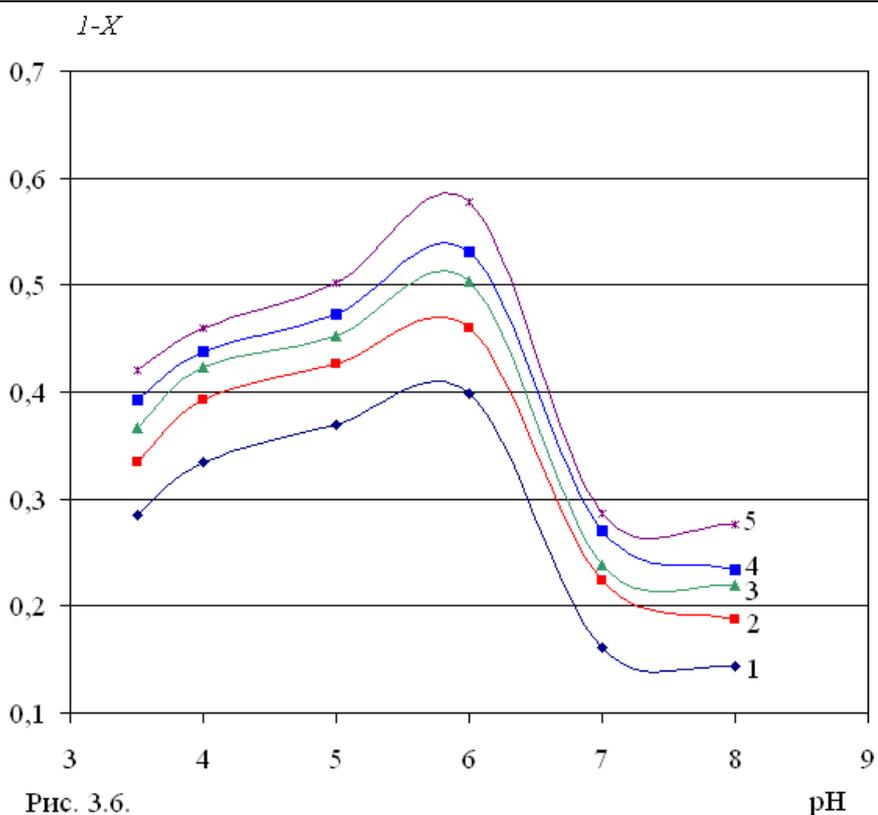


Рис. 3.6. Степень ассоциации флуоресценна в растворах бычьего сывороточного альбумина (150 мкМ) при различных концентрациях флуоресценна: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

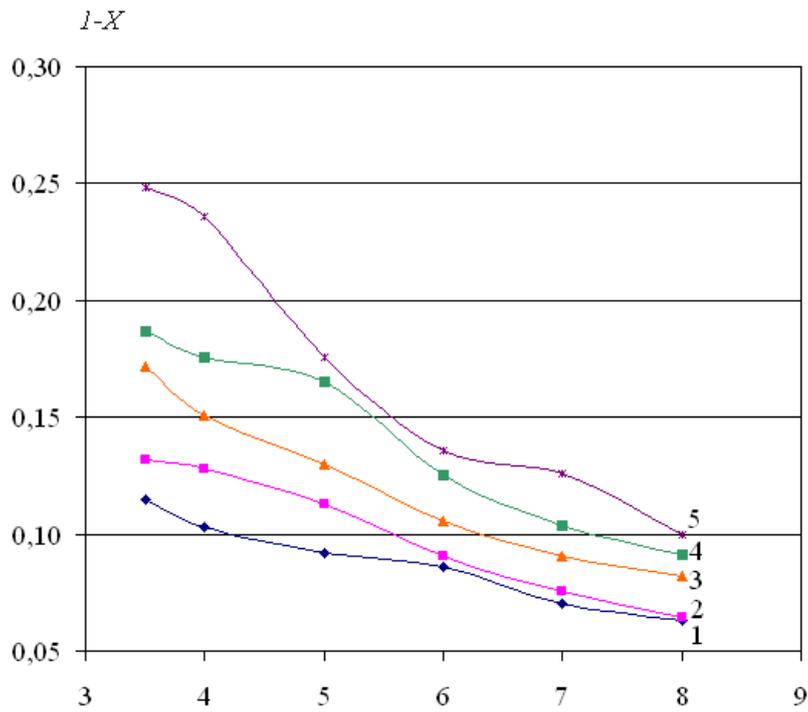


Рис. 3.7.

pH

Степень ассоциации эозина в растворах без белка при различных концентрациях эозина: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

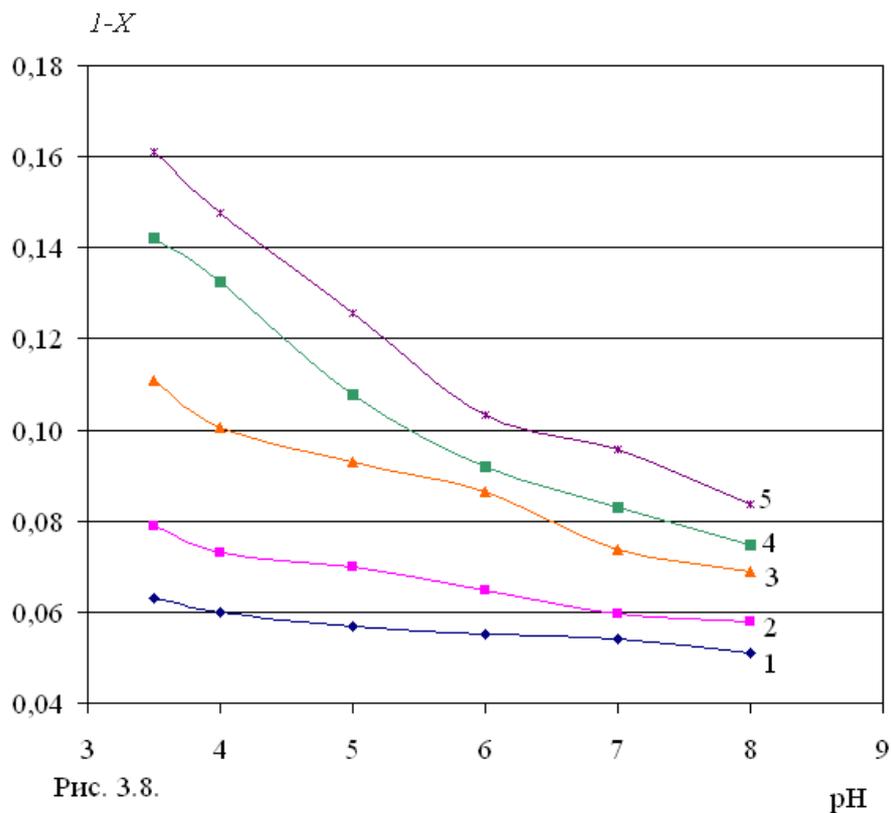
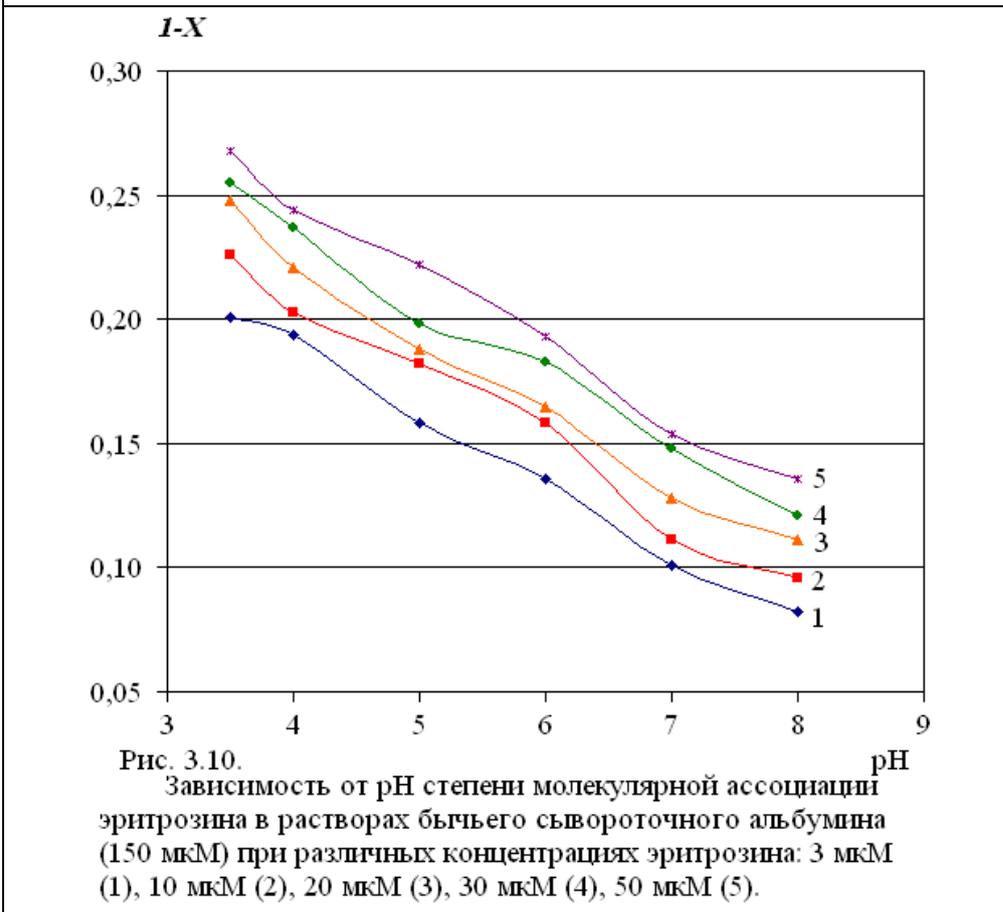
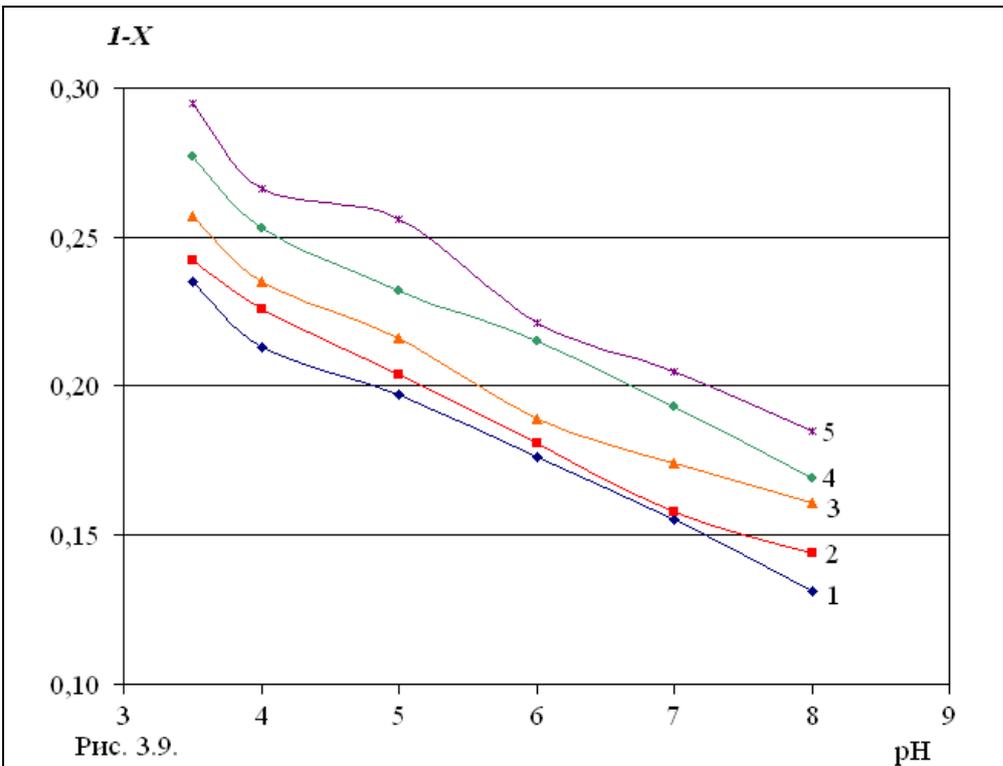


Рис. 3.8.

pH

Степень ассоциации эозина в растворах бычьего сывороточного альбумина (150 мкМ) при различных концентрациях эозина: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).



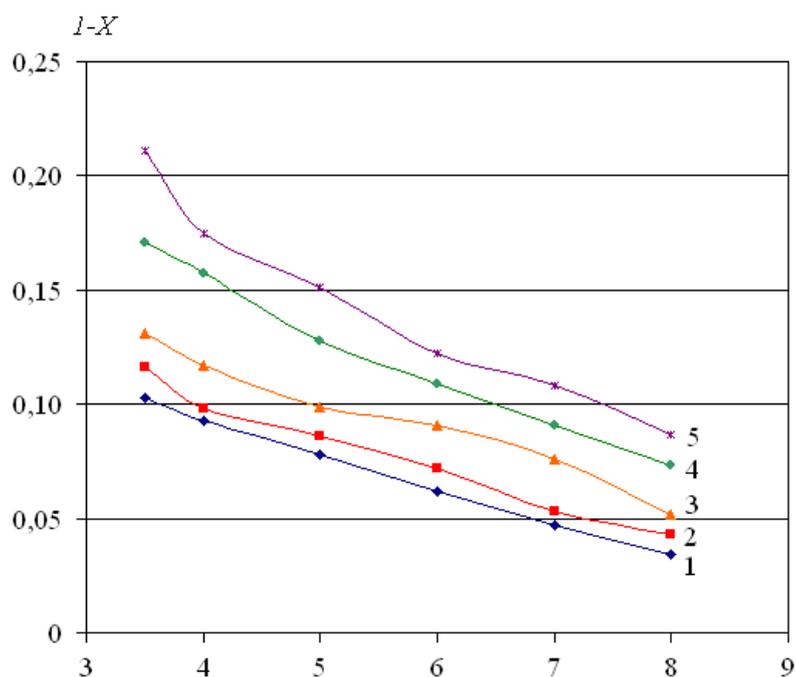


Рис. 3.11. Зависимость от рН степени молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах с его различными концентрациями: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

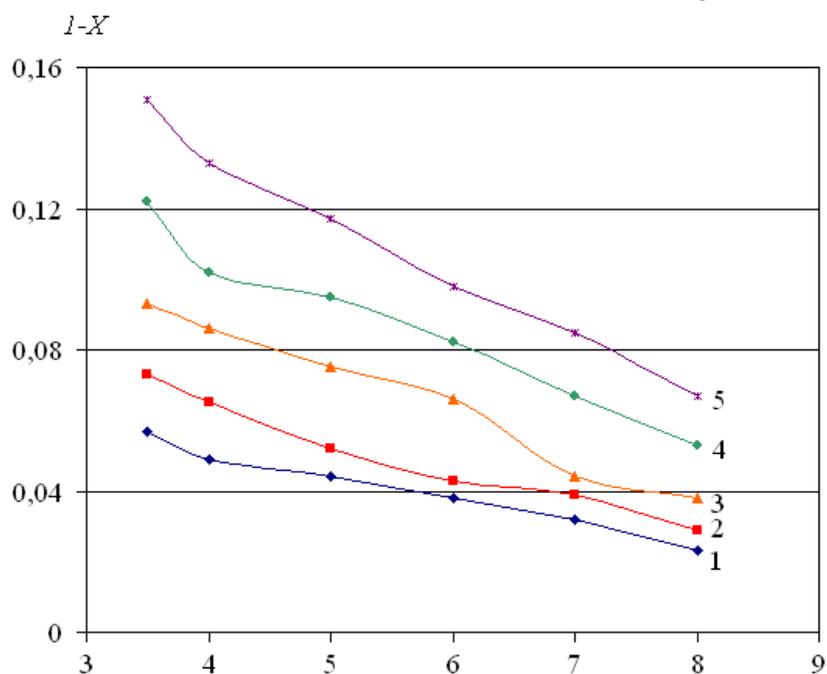


Рис. 3.12. Зависимость от рН степени молекулярной ассоциации бенгальского розового в растворах с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ) при различных концентрациях бенгальского розового: 3 мкМ (1), 10 мкМ (2), 20 мкМ (3), 30 мкМ (4), 50 мкМ (5).

На рис. 3.9 и рис. 3.10 представлены зависимости $I-X$ молекул эритрозина от рН в растворах без белка и с БСА соответственно, при различных концентрациях эритрозина.

При увеличении рН, как в растворах с белком, так и в растворах без белка, наблюдается монотонное уменьшение $I-X$ молекул эритрозина. При увеличении рН возрастает отрицательный заряд эритрозина. При $pH > 5,5$ молекулы эритрозина в форме дианионов, и их взаимное отталкивание мешает образованию ассоциатов. При $3,6 < pH < 5,5$ молекулы эритрозина переходят в форму моноаниона, что и облегчает их ассоциацию.

В растворах бычьего сывороточного альбумина $I-X$ эритрозина меньше $I-X$ эритрозина в растворах без белка при соответствующих значениях рН и концентрациях эритрозина. Уменьшение $I-X$ молекул эритрозина в белковых растворах объясняется связыванием наномаркера с молекулами БСА.

На рис. 3.11 и рис. 3.12 представлены зависимости $I-X$ молекул бенгальского розового от рН в растворах без белка и с БСА соответственно, при различных концентрациях красителя.

При увеличении рН, как в растворах с белком, так и в растворах без белка, наблюдается монотонное уменьшение $I-X$ бенгальского розового. При увеличении рН возрастает отрицательный заряд бенгальского розового. При $pH > 4,0$ молекулы бенгальского розового в форме дианиона, и их взаимное отталкивание мешает образованию ассоциатов. При $2,6 < pH < 4,0$ молекулы бенгальского розового переходят в слабо отрицательно заряженную форму моноаниона, что и облегчает их ассоциацию.

В растворах бычьего сывороточного альбумина $I-X$ бенгальского розового меньше $I-X$ бенгальского розового в растворах без белка при соответствующих значениях рН и концентрациях бенгальского розового. Уменьшение $I-X$ молекул бенгальского розового в белковых растворах объясняется связыванием наномаркера с молекулами альбумина.

Глава 4. Исследование спектров флуоресценция наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина (собственные результаты и их обсуждение)

Получены спектры флуоресценции флуоресцеина как в растворах без белка, так и в растворах с бычьим сывороточным альбумином при различных значениях рН: в качестве примера для рН 6,0 – рис. 4.1.

В растворах с белком при всех исследованных значениях рН наблюдается небольшое красное смещение положения максимума спектра флуоресценции флуоресцеина по сравнению с растворами без белка.

На рис.4.2 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектров флуоресценции ($I_{фл}^{макс}$) флуоресцеина от рН растворов, как содержащих БСА, так и не содержащих белок.

В растворах с БСА максимум спектра флуоресценции флуоресцеина смещается в красную область по сравнению с растворами без белка, например при рН 5,0 в растворах без белка максимум флуоресценции флуоресцеина на 510 нм, а в растворах с альбумином – на 515нм.

В растворах без белка при увеличении рН наблюдается увеличение $I_{фл}^{макс}$ флуоресцеина, что связано с изменением заряда наномаркера. При рН < 5,5 флуоресцеин находится в слабо положительно заряженной форме, обладающей небольшой способностью к флуоресценции. При $5,5 < рН < 6,8$ флуоресцеин электрически нейтрален. В области рН 6,8 – 8,0 флуоресцеин слабо отрицательно заряжен и находится в форме моноаниона. При рН > 8,0 флуоресцеин сильно отрицательно заряжен и находится в форме дианиона. Отрицательно заряженные формы флуоресцеина обладают большей интенсивностью флуоресценции. В растворах с БСА флуоресценция флуоресцеина тушится. По тушению флуоресценции наномаркера видно, что наибольшее связывание флуоресцеина с белком происходит при рН 5,0 – 6,0, когда молекулы флуоресцеина либо слабо положительно заряжены (при рН 5,0 – 5,5) либо электрически нейтральны (при рН 5,5 – 6,0), а белок слабо отрицательно заряжен (изоэлектрическая точка БСА рI 4,9).

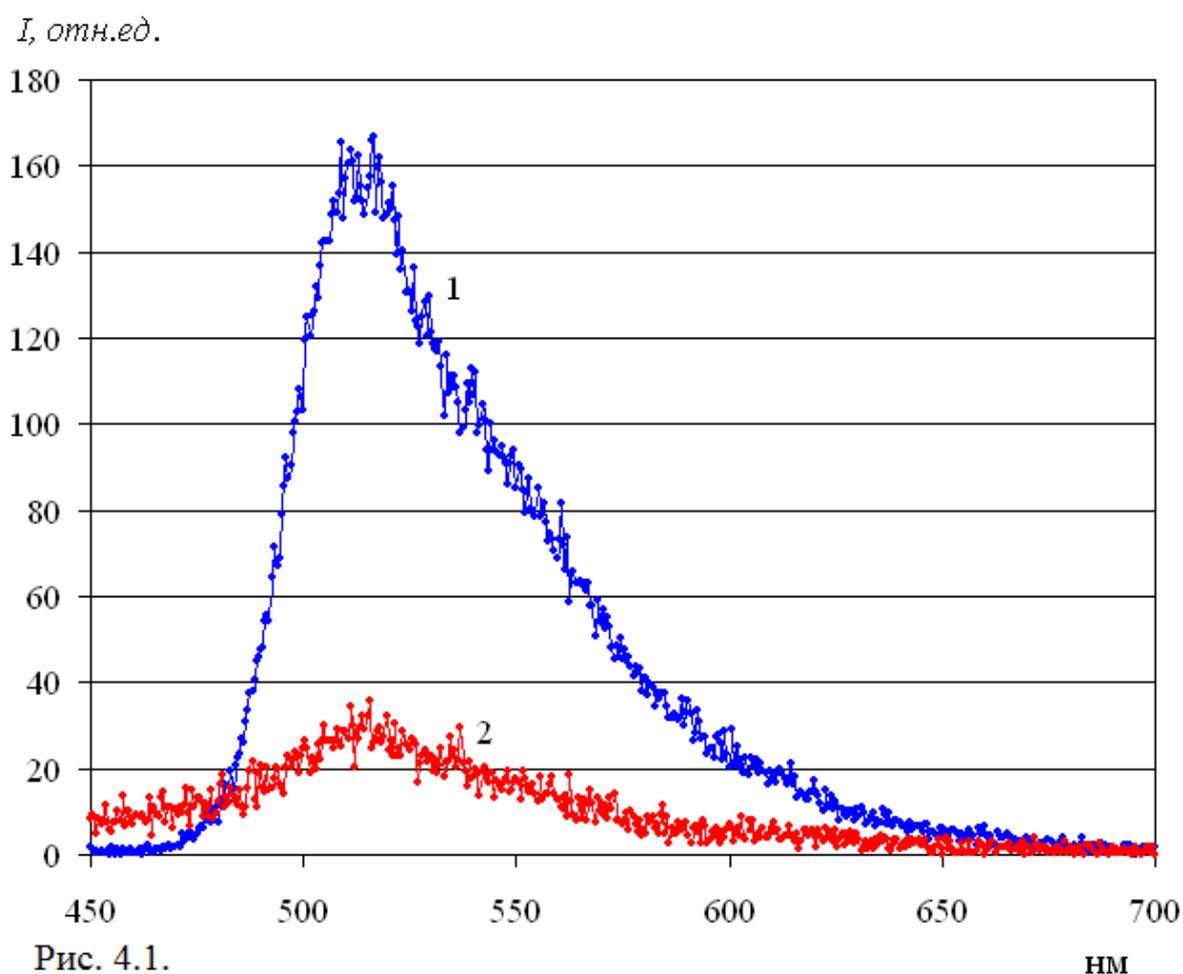


Рис. 4.1.

Спектры флуоресценции (возбуждение 440 нм) флуоресцеина (3 мкМ) в растворах (рН 6,0) без белка (1) и с 150 мкМ бычьим сывороточным альбумином (2).

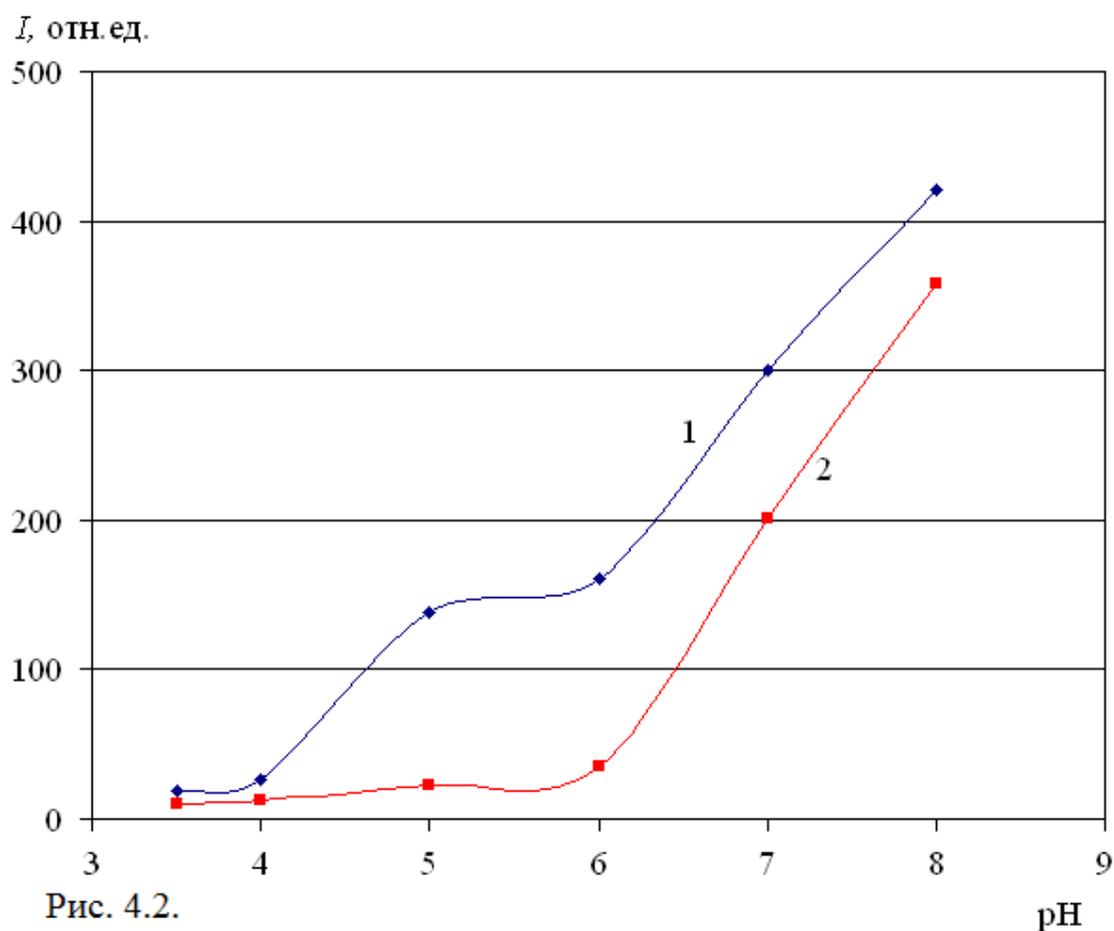


Рис. 4.2.
 pH
 Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции (возбуждение 440 нм) флуоресцеина (3 мкМ) в растворах без белка (1) и с 150 мкМ бычьим сывороточным альбумином (2).

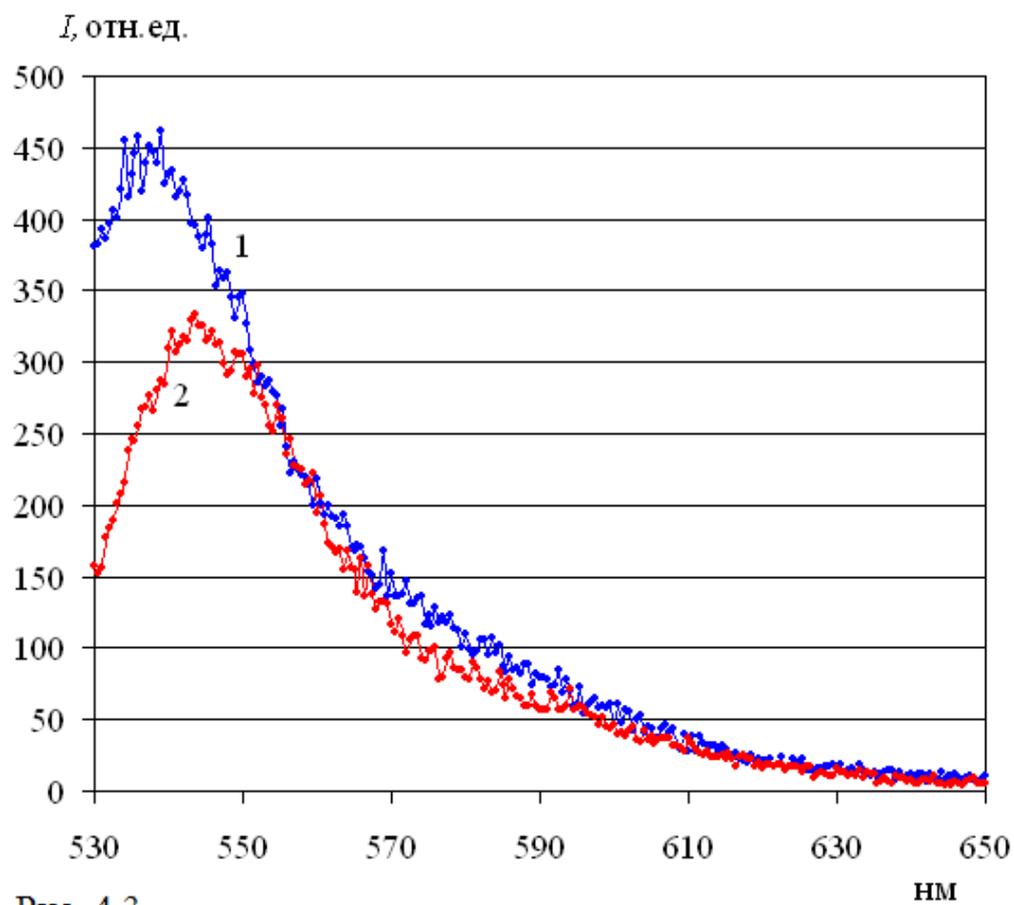


Рис. 4.3.

Спектры флуоресценции (возбуждение 520 нм) эозина (30 мкМ) в растворах (рН 7,0) без белка (1) и с 150 мкМ бычьим сывороточным альбумином (2).

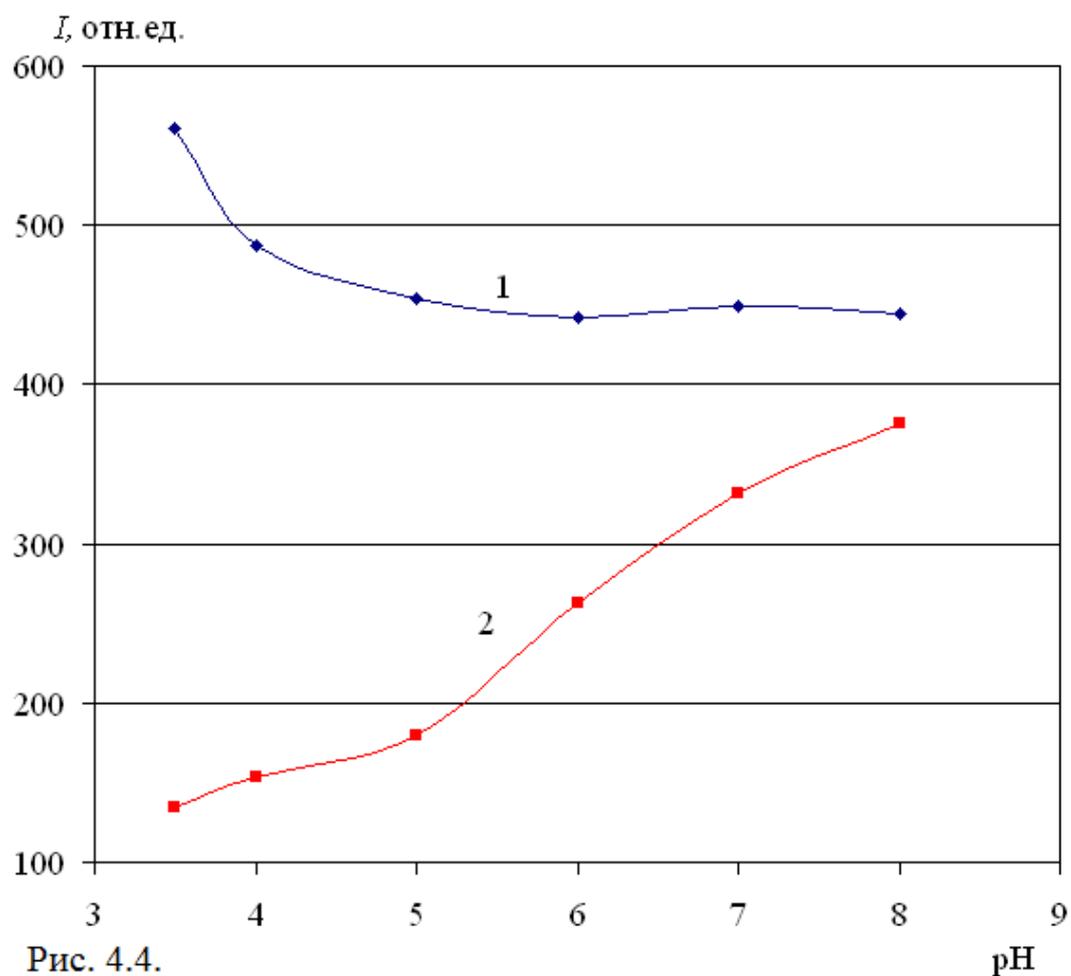


Рис. 4.4.
 Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции
 (возбуждение 520 нм) эозина (30 μM) в растворах без белка (1) и с
 150 μM бычьим сывороточным альбумином (2).

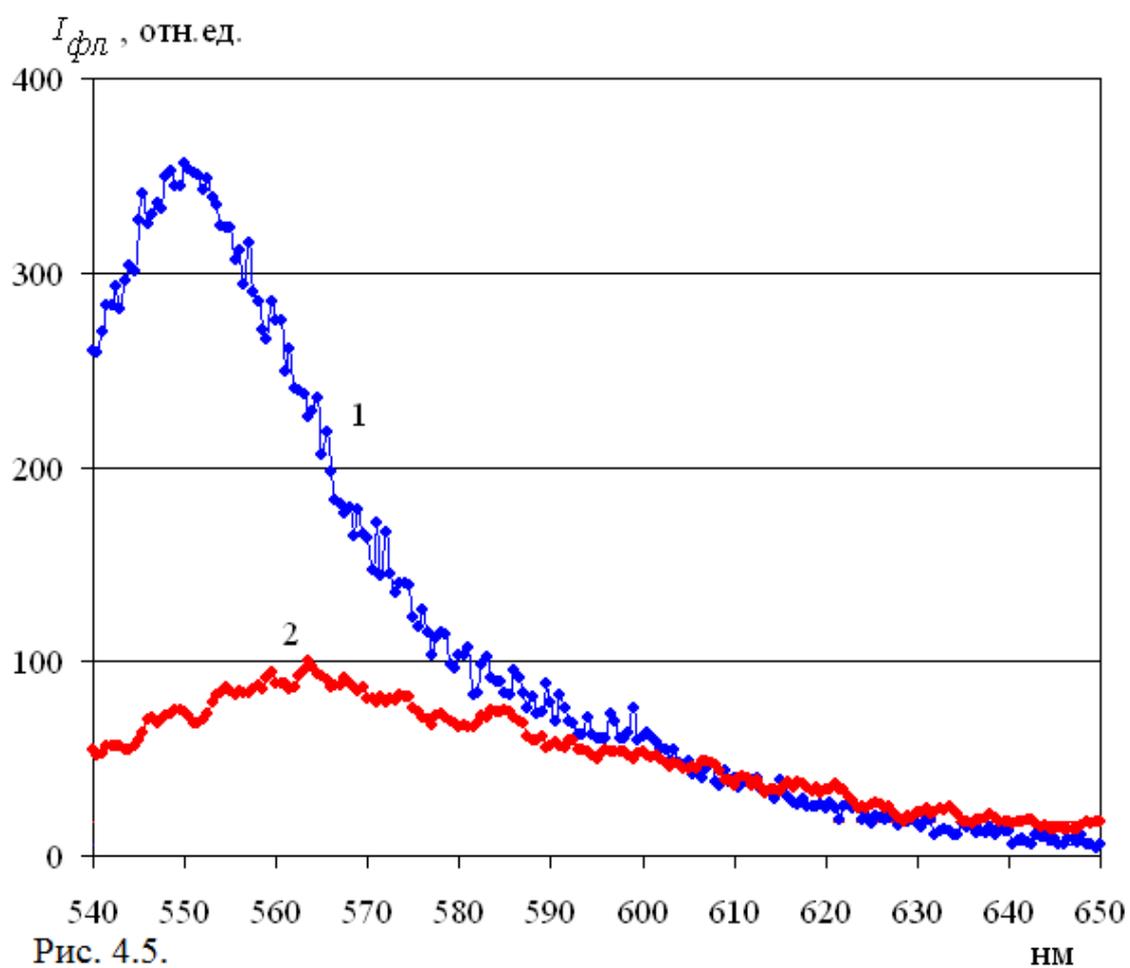


Рис. 4.5.
Спектры флуоресценции (возбуждение 530 нм) эритрозина (30 мкМ) в растворах (рН 5,0): 1 - без белка, 2 - с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ).

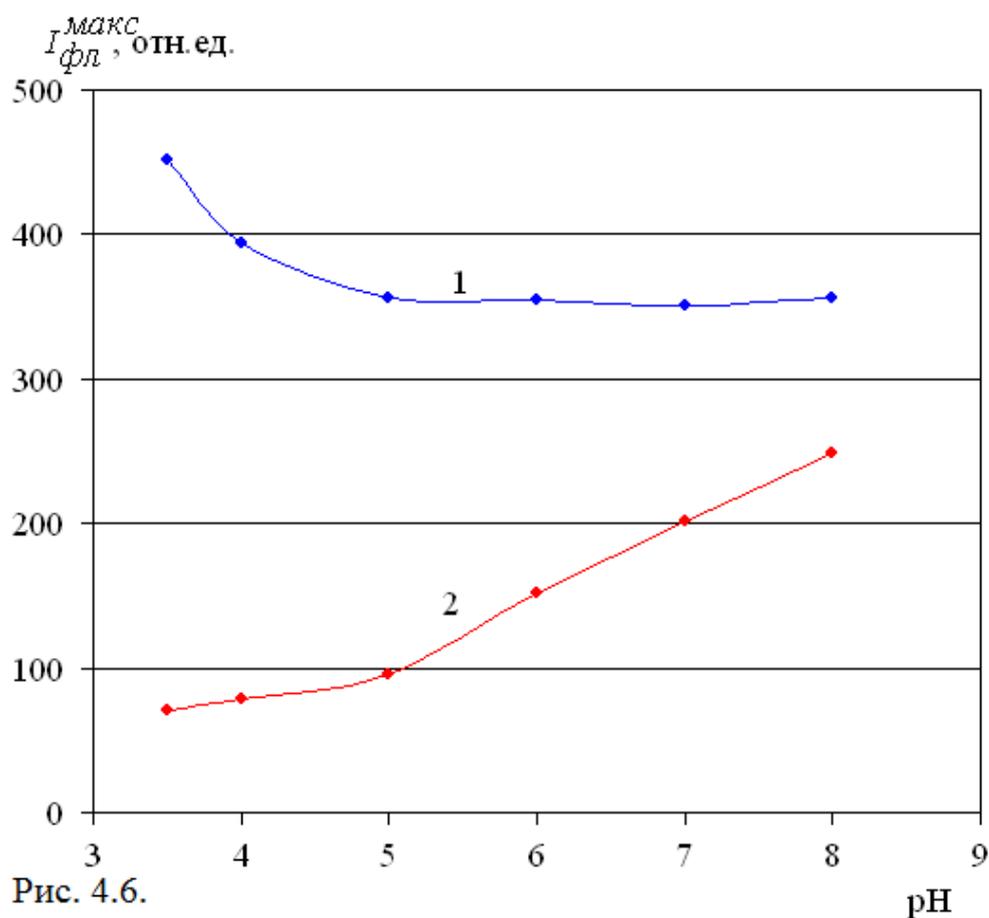


Рис. 4.6.

Интенсивность в максимуме спектра флуоресценции (возбуждение 530 нм) эритрозина (30 мкМ) в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ бычьего сывороточного альбумина (2) при различных значениях pH.

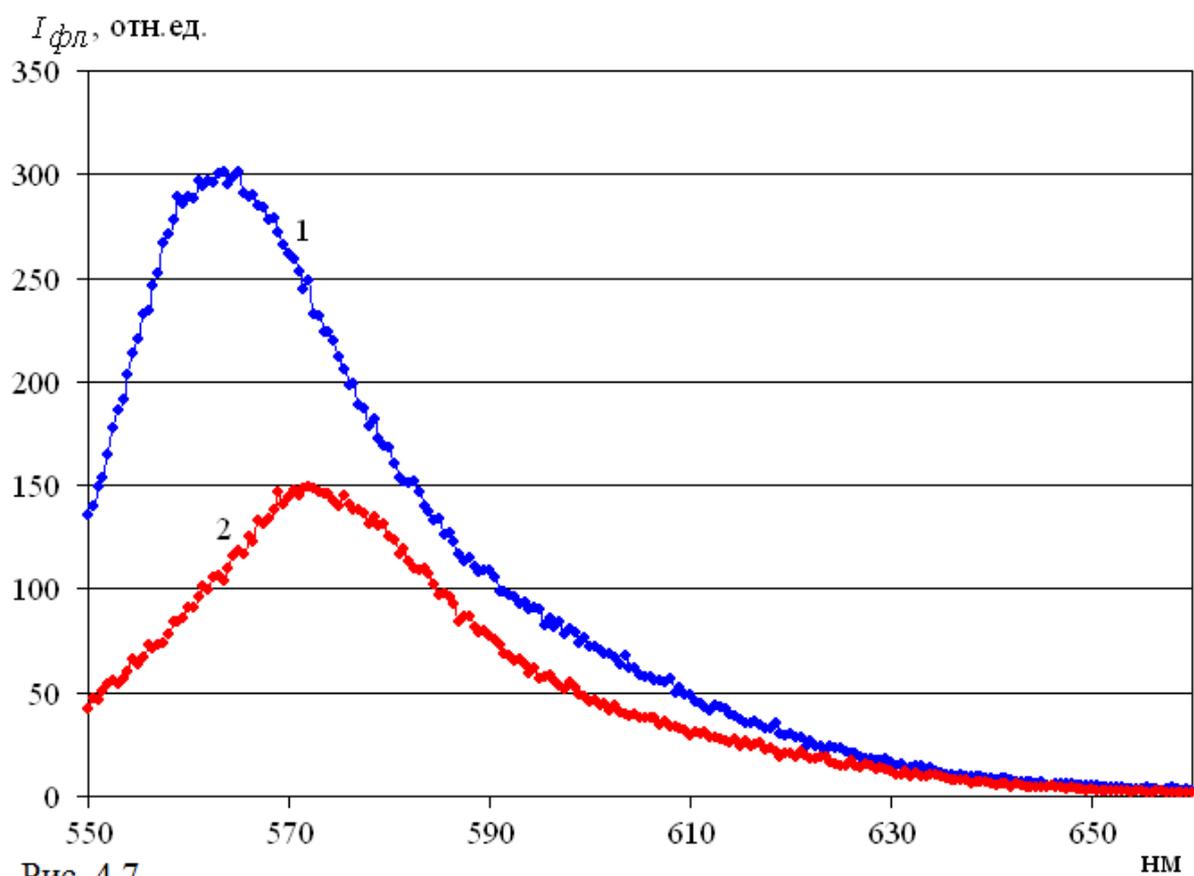


Рис. 4.7.

Спектры флуоресценции (возбуждение 540 нм) бенгальского розового (3 мкМ) в растворах (рН 4,0): 1 - без белка, 2 - с бычьим сывороточным альбумином (150 мкМ).

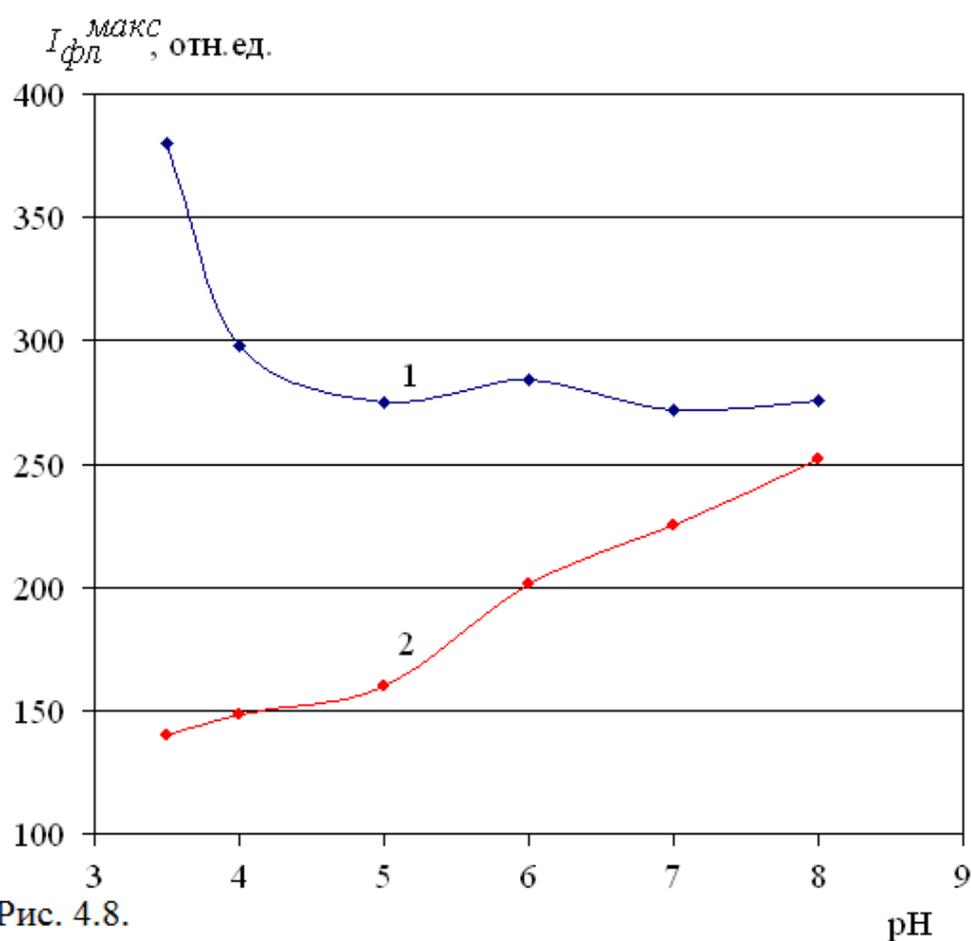


Рис. 4.8.

Інтенсивність в максимумі спектра флуоресценції (возбудження 540 нм) бенгальського розового (3 мкМ): 1 - в розворах без белка, 2 - в розворах бичього сывороточного альбуміна (150 мкМ).

Получены спектры флуоресценции эозина как в растворах без белка, так и в растворах с бычьим сывороточным альбумином при различных значениях рН: в качестве примера для рН 7,0 – рис. 4.3.

В растворах с белком при всех исследованных значениях рН наблюдается небольшое красное смещение положения максимума спектра флуоресценции эозина по сравнению с растворами без белка. Например, при рН 5,0 максимум спектра флуоресценции эозина в растворах без белка находится на 544 нм, в растворах с белком на – 555 нм.

На рис. 4.4 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектров флуоресценции ($I_{фл}^{макс}$) эозина от рН растворов, как содержащих бычий сывороточный альбумин, так и не содержащих белок.

В растворах без белка $I_{фл}^{макс}$ эозина уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением рН. При рН < 3,0 молекулы эозина электрически нейтральны. При 3,0 < рН < 5,0 эозин слабо отрицательно заряжен (моноанион), и слабо экранируется дипольными молекулами воды, поэтому $I_{фл}^{макс}$ высокая. При рН > 5,0 эозин заряжен сильно отрицательно (дианион), что вызывает его сильную экранировку молекулами воды и, соответственно, уменьшение $I_{фл}^{макс}$ по сравнению с рН, меньшими 5,0.

В растворах БСА наблюдается тушение флуоресценции эозина. Низкая интенсивность флуоресценции эозина в растворах белка при рН < 5,0 обусловлена интенсивным связыванием эозина (моноаниона при 3,0 < рН < 5,0) с положительно заряженным белком. Увеличение интенсивности флуоресценции эозина в растворах белка при увеличении рН связано с тем, что при рН > 5,0 отрицательно заряженные молекулы белка и эозина плохо связываются.

Получены спектры флуоресценции эритрозина как в растворах без белка, так и в растворах с бычьим сывороточным альбумином при различных значениях рН: в качестве примера для рН 5,0 – рис. 4.5.

В растворах с белком при всех исследованных значениях рН наблюдается небольшое красное смещение положения максимума спектра

флуоресценции эритрозина по сравнению с растворами без белка. Например, при рН 5,0 максимум спектра флуоресценции эритрозина в растворах без белка находится на 550 нм, в растворах с белком на – 566 нм.

На рис. 4.6 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектров флуоресценции ($I_{фл}^{макс}$) эритрозина от рН растворов, как содержащих бычий сывороточный альбумин, так и не содержащих белок.

В растворах без белка $I_{фл}^{макс}$ эритрозина уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением рН. При значениях рН < 3,6 молекулы эритрозина электрически нейтральны. При $3,6 < рН < 5,5$ эритрозин в форме моноаниона, и слабо экранируется дипольными молекулами воды, поэтому $I_{фл}^{макс}$ высокая. При рН > 5,5 эритрозин заряжен сильно отрицательно (дианион), что вызывает его сильную экранировку молекулами воды и, соответственно, уменьшение $I_{фл}^{макс}$ по сравнению с рН, меньшими 5,5.

В растворах бычьего сывороточного альбумина наблюдается тушение флуоресценции эритрозина. Низкая интенсивность флуоресценции эритрозина в растворах белка при значениях рН < 5,0 обусловлена интенсивным связыванием эритрозина (нейтральной молекулы при $3,5 < рН < 3,6$ и моноаниона при $3,6 < рН < 5,5$) с положительно заряженным белком. Увеличение интенсивности флуоресценции эритрозина в растворах белка при увеличении рН связано с тем, что при рН, больших 5,0 – 5,5, отрицательно заряженные молекулы белка и эритрозина плохо связываются.

Получены спектры флуоресценции бенгальского розового как в растворах без белка, так и в растворах с бычьим сывороточным альбумином при различных значениях рН: в качестве примера для рН 4,0 – рис. 4.7.

В растворах с белком наблюдается небольшое красное смещение положения максимума спектра флуоресценции бенгальского розового по сравнению с растворами без белка. Например, при рН 5,0 максимум спектра флуоресценции бенгальского розового в растворах без белка на 563 нм, в растворах с белком на – 572 нм.

На рис. 4.8 представлены зависимости интенсивности в максимуме спектров флуоресценции ($I_{фл}^{макс}$) бенгальского розового от рН растворов, как содержащих бычий сывороточный альбумин, так и не содержащих белок.

В растворах без белка $I_{фл}^{макс}$ бенгальского розового уменьшается, а затем выходит на постоянное значение с увеличением рН. При значениях рН $< 2,6$ молекулы бенгальского розового электрически нейтральны. При $2,6 < рН < 4,0$ бенгальский розовый слабо отрицательно заряжен (моноанион), и слабо экранируется дипольными молекулами воды, поэтому $I_{фл}^{макс}$ высокая. При рН $> 4,0$ бенгальский розовый заряжен сильно отрицательно (дианион), что вызывает его сильную экранировку молекулами воды и, соответственно, уменьшение $I_{фл}^{макс}$ по сравнению с рН, меньшими 4,0.

В растворах бычьего альбумина наблюдается тушение флуоресценции бенгальского розового. Низкая интенсивность флуоресценции бенгальского розового в растворах белка при рН $< 5,0$, обусловлена интенсивным связыванием бенгальского розового (моноаниона при $2,6 < рН < 4,0$ и дианиона при $4,0 < рН < 5,0$) с положительно заряженным белком. Увеличение интенсивности флуоресценции бенгальского розового в растворах белка при увеличении рН связано с тем, что при рН, больших 5,0, отрицательно заряженные молекулы белка и наномаркера плохо связываются.

Основные результаты и выводы работы

1. В работе проведен анализ молекулярной ассоциации наномаркеров семейства флуоресцеина – флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового – в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях pH.

➤ Зарегистрированы отличия в поведении степени ассоциации $I-X$ наномаркеров: у исходного соединения данного ряда – флуоресцеина – обнаружен нелинейный вид зависимости $I-X$ от pH с максимумом при pH 6,0, тогда как у галоген-производных флуоресцеина (эритрозина, эозина и бенгальского розового) зависимость $I-X$ от pH имеет монотонно убывающий характер при увеличении pH.

➤ Общей чертой для всех наномаркеров является уменьшение $I-X$ в растворах с бычьим сывороточным альбумином по сравнению с растворами без белка.

2. В работе проведен анализ флуоресцентных характеристик наномаркеров семейства флуоресцеина – флуоресцеина, эритрозина, эозина и бенгальского розового – в растворах бычьего сывороточного альбумина при различных значениях pH.

➤ В растворах с бычьим сывороточным альбумином у всех наномаркеров семейства флуоресцеина происходят тушение флуоресценции и красный сдвиг максимума спектра флуоресценции.

➤ Характер зависимости интенсивности флуоресценции наномаркера от pH различается для флуоресцеина и его галоген-производных (эритрозина, эозина и бенгальского розового).

Список цитируемой литературы

1. Л.В. Левшин, А.М. Салецкий, «Оптические методы исследования молекулярных систем», М., Издательство Московского университета, 1994.
2. Дж. Лакович, «Основы флуоресцентной спектроскопии», М., Мир, 1986.
3. Ю.А. Пентин, Л.В. Вилков, «Физические методы исследования в химии», Москва, АСТ, 2003.
4. Г.Е. Добрецов, «Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов», Москва, Наука, 1989.
5. В. Шмидт, «Оптическая спектроскопия для химиков и биологов», Москва, Техносфера, 2007.
6. А.Н. Теренин, «Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений», Москва, Наука, 1967.
7. L. Birla, A.-M. Cristian, M. Hillebrand, Absorption and steady state fluorescence study of interaction between eosin and bovine serum albumin. // *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, v. 60, p. 551-556.
8. S.M.T. Shaikh, J. Seetharamappa, P.B. Kandagal, D.H. Manjunatha, S. Ashoka, Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin. // *Dyes and Pigments*, 2006, v. 4, p. 1-7.
9. S.H. Lee, J.K. Suh, M. Li, Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile Blue fluorescence. // *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003, v. 24, p. 45-49.
10. Т.С. Дюбко, В.И. Сидоров, О.А. Соколик, И.Г. Ермоленко, С.У. Хабусева, Ю.Ю. Рожда, Л.Д. Паценкер, Сравнительное изучение взаимодействия флуоресцентных красителей К-35 и К7-1045 с белками

сыворотки крови крыс. // Вестник Харьковского национального университета. Серия Биология, 2009, Вып. 9, № 856, с. 11-19.

11. Е.М. Бухарова, И.М. Власова, А.М. Салецкий, Структура молекулярных ассоциатов флуоресцентных зондов в растворах сывороточного альбумина человека. // Журнал прикладной спектроскопии, 2008, т. 75, № 6, с. 782-787.

12. И.М. Власова, А.М. Салецкий, Зависимость констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с сывороточным альбумином человека от pH. // Журнал физической химии, 2010, т. 84, № 6, с. 1181–1186.

13. О.В. Степаненко, В.В. Верхуша, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов, Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии. // Цитология, 2007, т. 49, № 5, с. 395-420.

14. И.М. Власова, А.М. Салецкий, Индуцированная цетилтриметиламмонийбромидом денатурация сывороточного альбумина человека по собственной флуоресценции белка и флуоресценции наномаркера эозина. // Химическая физика, 2011, т. 30, № 4, с. 72–77.

15. О.А. Соколик, Т.С. Дюбко, Ю.И. Козин, И.А. Федюняева, Л.Д. Паценкер, Изучение влияния озона на сывороточный альбумин с применением флуоресцентных зондов на основе тозилатов 2- и 4-(4-диметиламинофенил)-1-этенил-1-алкилпиридиния (ДСП). // ДАН Украины, 2011, № 8, с. 136-145.

16. J. Zhu, J.-J. Li, J.-W. Zhao, Spectral characters of Rhodamine B as a multi-information fluorescence probe for bovine serum albumins. // Sensors and Actuators B, 2009, v. 138, p. 9–13.

17. D.J.R. Laurence, A study of the adsorption of dyes on bovine serum albumin by the method of polarization of fluorescence. // Biochem. Journ., 1952, v. 51, p. 168-180.

18. K. Egbaria, M. Friedman, Adsorption of fluorescein dyes on albumin microspheres. // *Pharmaceutical Research*, 1992, v. 9, № 5, p. 629-635.
19. A.S. Tatikolov, S.M.B. Costa, Complexation of polymethine dyes with human serum albumin: a spectroscopic study. // *Biophysical Chemistry*, 2004, v. 107, p. 33-49.
20. C. Sun, J. Yang, L. Li, X. Wu, Y. Liu, S. Liu, Advanced in the study of luminescence probes for proteins. // *Review. Journ. Chromatography B*, 2004, v. 803, p. 173-190.
21. F. Meadows, N. Narayanan, G. Patonay, Determination of protein – dye association by near infrared fluorescence-detected circular dichroism. // *Talanta*, 2000, v. 50, p. 1149-1155.
22. H.Y. Shrivastava, B.U. Nair, A fluorescence-based assay for nanogramquantification of proteins using a protein binding ligand. // *Anal. Bioanal. Chemistry*, 2003, v. 375, p. 169-174.
23. С. Паркер, «Фотолюминесценция растворов», Москва, Издательство «МИР», 1972.
24. Д. Браун, А.Флойд, М. Сейнзбери, «Спектроскопия органических веществ», Москва, Издательство «МИР», 1992.
25. В. С. Маряхина, В. В. Гуньков, Флуоресценция молекулярного зонда и его диффузия в биологической жидкости // *Компьютерные исследования и моделирование* 2012 Т. 4 № 1 С. 201–208.
26. М. А. Кордыш, К. А. Одынец, А. И. Корнелюк, Trp144 как флуоресцентный зонд для изучения конформационной подвижности С-модуля эукариотической тирозил-тРНК синтетазы// ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2003. Т. 19. № 5 С/436-439.

27. Zhu X., Sun J., Hu Y. Determination by hydroxypropyl – beta – cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescence probe.// *Anal Chim Acta*, 2007, v. 596(2), p. 298 – 302.
28. Goswami N., Makhal A., Pal SK. Toward an alternative intrinsic probe for spectroscopic characterization of a protein. // *J. Phys. Chem. B.*, 2010, v. 114, p. 46.
29. Suresh I Prajapati, Carlo O Martinez, Ali N Bahadur, Isabel Q Wu, Wei Zheng, James D Lechleiter, Linda M McManus, Gary B Chosholm, Joel E Michalek, Paula K Shireman, Charles Keller. Near-Infrared Imaging of Injured Tissue in Living Subjects using IR-820.// *Mol Imaging*, 2009, 8(1), p. 45-54.
30. Власова И. М., Салецкий А. М., Анализ защитного действия ишемического прекондиционирования по спектрам флуоресценции сыворотки крови и добавленных в нее зондов// *Журнал прикладной спектроскопии*, 2007, т. 74, № 3, с. 378-381.
31. Домнина Н.А., Королев А.Ф., Потапов А.В., Салецкий А.М., Влияние СВЧ-излучения на процессы ассоциации молекул родамина бж в водных растворах // *Журнал прикладной спектроскопии*, 2005, т. 72, № 1, с. 34-37.
32. Власова И. М., Бухарова Е. М., Салецкий А. М., Вращательная диффузия маркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека // *Журнал физической химии*, 2011, т. 85, № 5, с. 964-969.
33. Салецкий А. М., Мельников А. Г., Правдин А. Б., Кочубей В. И., Мельников Г. В., Комплексообразование пирена и антрацена с плазмой крови человека // *Журнал прикладной спектроскопии*, 2008, т. 75, № 3, с. 379-382.
34. Власова И. М., Гордеева Ю. А., Власов А. А., Салецкий А. М., Определение констант связывания наномаркеров семейства флуоресцеина с

сывороточным альбумином человека, // Вестник московского университета. серия 3: физика. астрономия, 2012, № 2, с. 60-64.

35. Плавский В. Ю., Мостовников В. А., Мостовникова Г. Р., Третьякова А. И., Спектрально-флуоресцентные и поляризационные характеристики Z,Z-билирубина IX α , // Журнал прикладной спектроскопии, 2007, т. 74, № 1, с. 108-119.

36. Власова И. М., Кулешова А. А., Салецкий А. М., Флуоресцентные характеристики и молекулярная ассоциация наномаркера бенгальского розового в растворах сывороточного альбумина человек, // Вестник московского университета. серия 3: физика. астрономия, 2011, № 5, с. 44-48.

37. Сенчук В. В., Бондарюк Е. В, Флуоресцентный анализ взаимодействия флавонолов с гемоглобином и бычьим сывороточным альбумином, // Журнал прикладной спектроскопии, 2007, т. 74, № 5, с. 659-664.

38. Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А., Сырейщикова Т.И., Смолина Н.В., Светличный В.Ю., Поляк Б.М., Флуоресцентный зонд К-35 для исследования альбумина: оптические свойства // Биофизика, 2012, т. 57, № 3, с. 405-409.

39. Ferrer M.L., Duchowicz R., Carrasco B., Garsia de la Torre J., Acuna A.U. The conformation of serum albumin in solutions: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study. // Biophysical Journal, 2001, v. 80, p. 2422-2430.

40. Власова И.М., Землянский А.Ю., Салецкий А.М. Спектрально-люминесцентные характеристики эозина в растворах сывороточного альбумина человека при его денатурации под воздействием додецилсульфата натрия. // Журнал Прикладной Спектроскопии, 2006, т. 73, № 5, с. 661-665.

41. X. Diaz, E. Aduin, E. Lissi «Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations Its relationship to surfactant-protein association», //Journal of Photochemistry and Photobiology, 2002, 157-162.

42. Sebnem Ercelen, Andrey S., Klymchenko, Alexandr P. Demchenko «Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin, //FEBS Letters, 2002, 25-28.
43. Н. А. Немкович, Ю. В. Крученюк, А. Н. Собчук, Х. Детерт, Н. Вробель, Е. Субнаносекундная спектрофлуориметрия новых производных индолакарбазола в растворах и комплексах с белками и их дипольные моменты, // Оптика и спектроскопия, 2009, т. 107, № 2, с. 292-299.
44. А. Г. Мельников, А. М. Салецкий, В. И. Кочубей, А. Б. Правдин, И. С. Курчатова, Г. В. Мельников, Триплет-триплетный перенос энергии между люминесцентными зондами, связанными с альбуминами, //Оптика и спектроскопия, 2010, т. 109, № 2, с. 216-221.
45. А. С. Кашин, А. С. Татиколов, Спектрально-флуоресцентное изучение взаимодействия анионных цианиновых красителей с сывороточными альбуминами, //Химия высоких энергий, 2009, т. 43, № 6, с. 536-544.
46. А. С. Татиколов, А. А. Ищенко, М. А. Кудинова, И. Г. Панова, Исследование нековалентного взаимодействия скварилиевых красителей с сывороточными альбуминами, //Химия высоких энергий, 2010, т. 44, № 4, с. 333-339.
47. Е. А. Слюсарева, Ф. Н. Томилин, А. Г. Сизых, Е. Ю. Танкевич, А. А. Кузубов, С. Г. Овчинников, Влияние галогензамещения на структуру и электронные спектры флуороновых красителей, //Оптика и спектроскопия, 2012, т. 112, № 5, с. 729-737.
48. Т. М. Акимкин, А. С. Татиколов, С. М. Ярмолюк, Спектрально-флуоресцентное изучение взаимодействия цианиновых красителей суан 2 и суан 45 с ДНК, //Химия высоких энергий, 2011, т. 45, № 3, с. 252-259.
49. В. П. Казаков, С. С. Остахов, Г. Г. Фаррахова, Фотоиндуцированный перенос электрона из высоковозбужденных синглетных состояний

триптофана. Влияние длины волны возбуждения, рН и температуры на тушение флуоресценции триптофана ионом $\text{Eu}(\text{III})$, //Химия высоких энергий, 2008, т. 42, № 4, с. 325-328.

50. А. Б. Правдин, В. И. Кочубей, А. Г. Мельников Фосфоресцентный зонд – эозин, в исследовании структурных изменений в гликированных белках // Оптика и спектроскопия, 2010, т. 109, № 2, с. 222–225.