

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНО-  
КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ В  
РАСТВОРАХ БЕЛКА**

Выполнил студент

405 группы:

Городничев Евгений Сергеевич

\_\_\_\_\_   
подпись студента

Научный руководитель:

Доктор ф.-м. наук, профессор

Салецкий А.М.

\_\_\_\_\_   
подпись научного руководителя

Соруководитель:

Аспирантка

Кулешова А.А.

\_\_\_\_\_   
подпись соруководителя

Допущен к защите <дата>

Зав. кафедрой \_\_\_\_\_   
подпись зав. кафедрой

Москва

## Оглавление

<b>Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1. Применение красителей в исследованиях биологических объектов (литературный обзор)</b>	
§1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии.....	5
§1.2. Флуоресцентные наномаркеры (К-35, бенгальский розовый).....	11
§1.3. Применение флуоресцентных красителей в исследованиях белковых молекул.....	13
<b>Глава 2. Методическая часть эксперимента</b>	
§2.1. Приготовление растворов красителя К-35 в растворах с и без бычьего сывороточного альбумина.....	20
§2.2. Приготовление растворов красителя бенгальского розового в растворах с и без бычьего сывороточного альбумина.....	20
§2.3. Методика экспериментов на шестнадцатиканальном спектрометре TCSPC-модуль SPC-140.....	20
<b>Глава 3. Исследование процессов взаимодействия флуоресцентных наномаркеров с белком</b>	
§3.1. Исследование процессов взаимодействия К-35 с белком.....	22
§3.2. Исследование процессов взаимодействия бенгальского розового с белком.....	26

§3.3. Сравнительный анализ процесса соединения двух красителей с бычьим сывороточным альбумином.....	30
<b>Основные результаты и выводы.....</b>	<b>32</b>
<b>Список цитируемой литературы.....</b>	<b>33</b>

## Введение

Методы оптики и спектроскопии с применением флуоресцентных красителей широко используются в современной биофизике и медицине для исследования биологических систем. С их помощью можно распознавать молекулы и различные вещества, а также получать качественные и количественные характеристики исследуемых объектов. В частности, на основе данных методов исследуется строение сывороточных альбуминов (человека и быка).

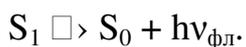
Бычий сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок плазмы крови (молекулярная масса 64 кДа, изоэлектрическая точка pI 4,9). Его концентрация в плазме и сыворотке (35-55 мг/мл) выше, чем концентрация других белков. Молекулы бычьего сывороточного альбумина состоят из 582 аминокислотных остатков.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

Выбор бычьего сывороточного альбумина в данной работе обусловлен важной ролью этого белка в плазме крови. В лабораторных исследованиях бычий сывороточный альбумин применяется в качестве стандарта в различных методах количественного определения белков, а также является удобной моделью для изучения свойств глобулярных белков в целом. Именно альбумин вносит основной вклад во внутрисосудистое коллоидно-осмотическое давление, регулирует вместе с другими белками плазмы pH крови, а также является молекулой-переносчиком биологически важных веществ.

# Глава 1. Применение красителей в исследованиях биологических объектов (литературный обзор)

## §1.1. Физические основы флуоресцентной спектроскопии

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



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

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

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

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

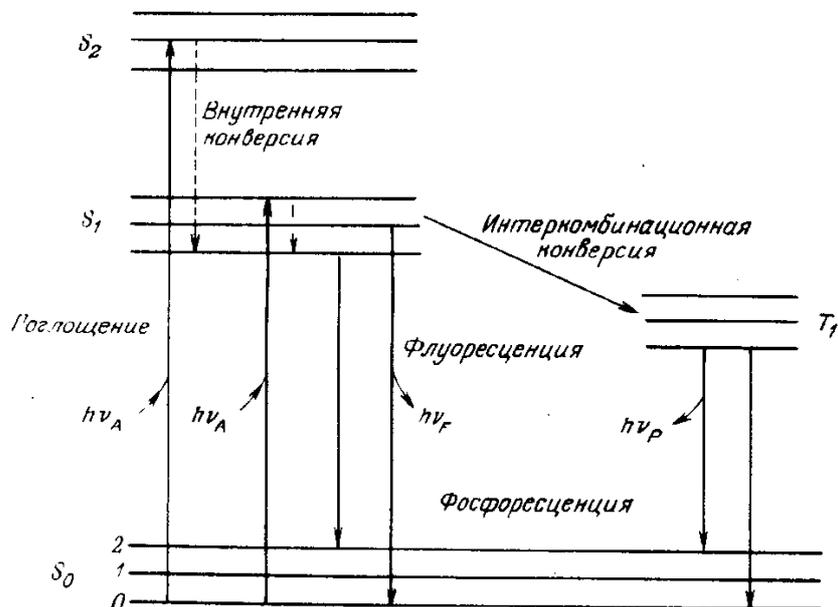


Рисунок 1 - Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы

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

Одним из важных свойств флуоресценции является различие её длительности у разных излучающих систем. Длительность свечения вещества обычно представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекулы остаются в возбуждённом состоянии.

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

$$dN_{21}(t) = -A_{21}N_2(t)dt, \quad (1.1.1)$$

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

Выражение (1.1.1) в случае сложной молекулярной системы описывает убыль молекул на низшем колебательном уровне верхнего электронного состояния за счёт перехода на нижний колебательный уровень основного электронного состояния (0-0-переход). Для реальной молекулярной системы уменьшение заселённости  $N_2(t)$  уровня (2) будет происходить не только за счёт 0-0-переходов, но и в результате других переходов с рассматриваемого верхнего уровня на разные колебательные уровни основного электронного состояния. Тогда полная убыль молекул  $dN_2(t)$  за счёт всех возможных переходов с данного возбуждённого уровня на все нижерасположенные электронно-колебательные уровни может быть определена как

$$dN_2(t) = -\Sigma dN_{21} = -N_2(t)dt\Sigma A_{21} \quad (1.1.2)$$

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

$$A = \Sigma A_{21}, \quad (1.1.3)$$

то для  $dN_2(t)$  получим уравнение

$$dN_2(t) = -AN_2(t)dt. \quad (1.1.4)$$

Интегрируя его, получим

$$N_2(t) = N_2(0)e^{-At}. \quad (1.1.5)$$

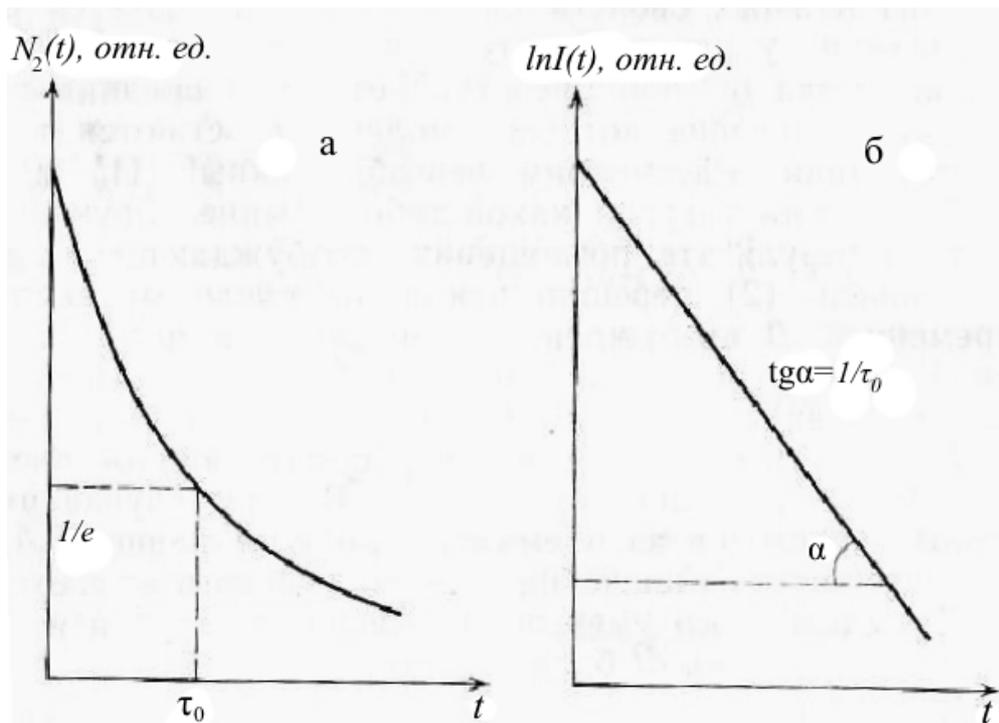


Рисунок 2-Зависимость  $N_2$  (а) и  $\ln I$  (б) от времени  $t$

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

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

$$dN_2(t) = -AN_2(t)e^{-At}dt. \quad (1.1.6)$$

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

$$dN_2(t) / N_2(0) = Ae^{-At}dt \quad (1.1.7)$$

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

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} tAe^{-At}dt = \tau_0. \quad (1.1.8)$$

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

Длительность возбуждённого состояния можно определить и иным путём. Для характеристики зависимости  $N_2(t)$  (рис. 2(а)) введём время  $\tau_0$ , в течение которого число возбуждённых частиц уменьшается в  $e$  раз. Это время легко находится из уравнения (1.1.5):

$$N_2(\tau) = N_2(0)e^{-A\tau} = \frac{N_2(0)}{e}, \quad (1.1.9)$$

откуда

$$\tau = \tau_0. \quad (1.1.10)$$

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

$$I(0) = AN_2(0)h\nu. \quad (1.1.11)$$

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

$$I(t) = AN_2(t)h\nu = AN_2(0)e^{-At}h\nu = I(0)e^{-t/\tau_0}, \quad (1.1.12)$$

Выражение (1.1.12) описывает закон затухания люминесценции.

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

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} tI(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} \quad (1.1.13)$$

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

## §1.2. Флуоресцентные наномаркеры (К-35, бенгальский розовый)

При анализе собственной флуоресценции исследуемых биологических материалов не всегда можно получить полную информацию об объекте. В

этом случае используют искусственные флуорофоры, т.е. специально синтезированные вещества, имеющий специфический спектр флуоресценции либо в свободном состоянии, либо при связывании с тем или иным объектом исследования. Флуоресценция таких веществ (зондов, меток, маркеров), как правило, обладает высоким квантовым выходом и достаточно большим временем жизни.

Для данной работы были выбраны флуоресцентные красители К-35 (N-(карбоксифенил)имид4-(диметиламино)нафталевааякислота), структурная формула которого изображена на рисунке 3, и бенгальский розовый (4,5,6,7-тетрахлоро-2',4',5',7'-тетрайодофлуоресцеин), структурная формула которого изображена на рисунке 4.

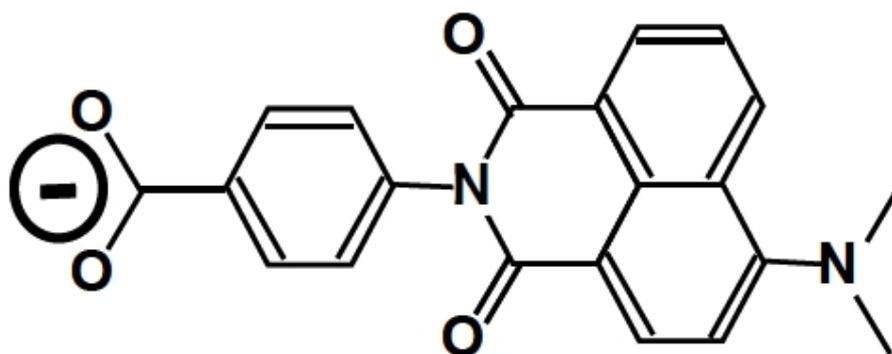


Рисунок 3 - Структурная формула К-35

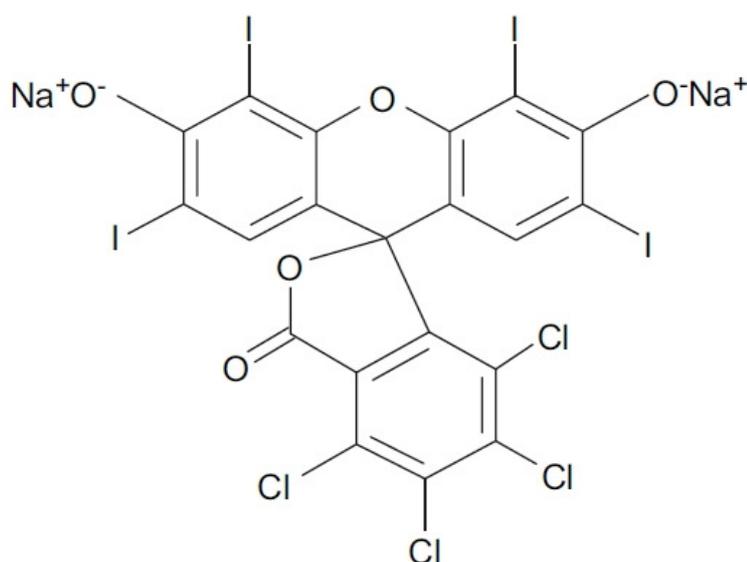
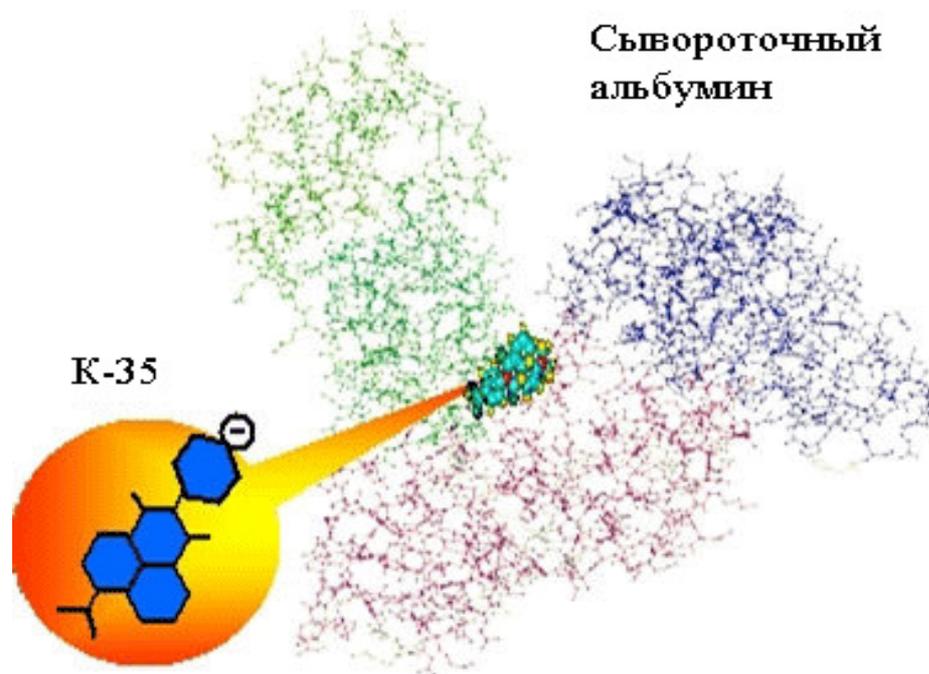


Рисунок 4 - Структурная формула бенгальского розового

К-35 был специально разработан для исследований альбуминов. Краситель имеет несколько значений длины волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 380; 405; 436$  нм. Одной из отличительных черт маркера К-35 является его способность присоединяться ко всеми связывающими центрами сывороточных альбуминов (рисунок 5). При  $pH=7,0$  К-35 нейтрален, при значениях  $pH > 7,0$  он отрицательно заряжен, при меньших  $7,0$  молекулы красителя положительно заряжены.

Бенгальский розовый является флуоресцентным анионным при физиологическом  $pH 7,4$  наномаркером семейства флуоресцеина, одна из отличительных характеристик которого заключается в присоединении к одному (первому) связывающему центру сывороточного альбумина. Длина волны возбуждения данного красителя  $\lambda_{ex} = 540$  нм. В области  $pH < 2,6$  молекулы этого маркера электрически нейтральны, при  $2,6 < pH < 4,0$  молекулы бенгальского розового слабо отрицательно заряжены (моноанионы), при значениях  $pH$  выше  $4,0$  молекулы наномаркера сильно отрицательно заряжены (дианионы).



*Рисунок 5 - Схематическое изображение процесса связывания красителя К-35 с сывороточным альбумином*

### **§1.3. Применение флуоресцентных красителей в исследованиях белковых молекул**

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

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

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

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

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

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

Работа [10] посвящена исследованию взаимодействия флуоресцентного скварейного красителя с сывороточными альбуминами методами флуоресцентной спектроскопии. Результаты исследования показывают, что в присутствии сывороточных альбуминов человека и быка наблюдается значительное увеличение интенсивности флуоресценции (в 24-190 раз), в то время как в присутствии других альбуминов интенсивность флуоресценции изменяется в гораздо меньшей степени – увеличивается не более, чем в 24 раза.

Статья [11] также посвящена изучению скварейна и его модификаций в качестве флуоресцентных маркеров для детектирования альбуминов

методами флуоресцентной спектроскопии. Результаты данных исследований схожи с результатами, описанными в [12]. Присутствие в растворе альбуминов влияет на увеличение интенсивности флуоресценции.

В работе [12] рассматривается процесс связывания широко используемого в биологических исследованиях флуоресцентного красителя сульфородамина В (SRB) с молекулами сывороточного альбумина человека. Исследования проводятся методом флуоресцентной спектроскопии. Соединение с сывороточным альбумином человека приводит к увеличению интенсивности флуоресценции красителя.

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

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

В работе [15] методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии изучены нековалентные взаимодействия между полиметиновыми красителями различных типов (катионными и анионными тиокарбоцианинами, анионными оксонолами и тетрацианополиметинами) и сывороточным альбумином человека. Соединение с протеином приводит к сдвигу в длинноволновую область спектра поглощения красителя и, в большинстве случаев, к увеличению квантового выхода флуоресценции.

В статье [16] приведены результаты изучения некоторых аспектов взаимодействия флуоресцентного зонда CAPIDAN с молекулами

сывороточного альбумина человека с помощью оптических методов и компьютерного моделирования. Данный краситель широко применяется в качестве детектора структурных изменений в сывороточном альбумине человека при некоторых заболеваниях.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Статья [26] посвящена изучению флуоресцентного красителя ADOТА, представляющего собой красный флуорофор, внедрённого в кремниевые и поливиниловые тонкие плёнки. Флуоресцентные характеристики данного красителя были исследованы методами стационарной и разрешённой по времени флуоресцентной спектроскопии.

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

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

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

Авторами [30] было синтезировано легированное празеодимом стекло  $\text{BiB}_3\text{O}_6$  и изучен ряд его свойств методами стационарной спектроскопии и спектроскопии люминесценции с высоким временным разрешением.

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

Статья [32] посвящена изучению побочных эффектов, вызванных взаимодействием белков с акриламидом, наиболее часто используемым в качестве тушителя флуоресценции при исследованиях белковых структур.

Подобные взаимодействия зачастую приводят к искажению результатов экспериментов по определению времени жизни флуоресценции.

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

Интерес к применению флуоресцентных красителей (зондов, наномаркеров) неслучаен. Флуорофоры позволяют изучать биологические объекты, выявлять изменения в структуре клеток, тканей, компонент крови за ограниченный промежуток времени при малом количестве исследуемого образца.

## **Глава 2. Методическая часть эксперимента**

### **§2.1. Приготовление растворов красителя К-35 в растворах с и без бычьего сывороточного альбумина**

Для исследования флуоресцентных и кинетических характеристик красителя К-35 и его взаимодействия с бычьим сывороточным альбумином были приготовлены буферные растворы:

- 1) 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 0,1 М  $\text{KOH}$ , pH (3,5 – 5,0)
- 2) 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 М  $\text{NaOH}$ , pH (6,0 – 8,0)

и раствор 150 мкМ бычьего сывороточного альбумина (БСА).

На их основе были приготовлены растворы К-35 с БСА и без БСА с различными значениями pH (3,5 – 8,0).

### **§2.2. Приготовление растворов красителя бенгальского розового в растворах с и без бычьего сывороточного альбумина**

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

- 1) 0,1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 0,1 М  $\text{KOH}$ , pH (3,5 – 5,0)
- 2) 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1 М  $\text{NaOH}$ , pH (6,0 – 8,0)

и растворы 150 мкМ бычьего сывороточного альбумина (БСА)

На их основе были приготовлены растворы бенгальского розового с БСА и без белка с различными значениями pH (3,5 – 8,0).

### **§2.3. Методика экспериментов на шестнадцатиканальном спектрометре TCSPC-модуль SPC-140**

Исследование времени затухания флуоресценции флуоресцентных красителей К-35 и бенгальского розового в растворах с БСА и без белка с

различными значениями рН (3,5 – 8,0) осуществлялось с помощью шестнадцатиканального TCSPC-модуля SPC-140 (Becker & Hickl).

Флуоресценция К-35, как в растворах с БСА, так и в растворах без белка, возбуждалась светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 405$  нм.

Флуоресценция бенгальского розового в растворах с и без БСА возбуждалась светом с длиной волны  $\lambda_{\text{возб}} = 510$  нм.

При измерении образцы помещались в кювету при комнатной температуре.

## Глава 3. Исследование процессов взаимодействия флуоресцентных наномаркеров с белком

### §3.1. Исследование процессов взаимодействия К-35 с белком

Получены кривые зависимости интенсивности флуоресценции красителя К-35 как в растворах с БСА, так и в растворах без белка для различных значений рН от времени в пикосекундном диапазоне. Данные зависимости отображают процесс затухания флуоресценции и представлены на рисунке 6.

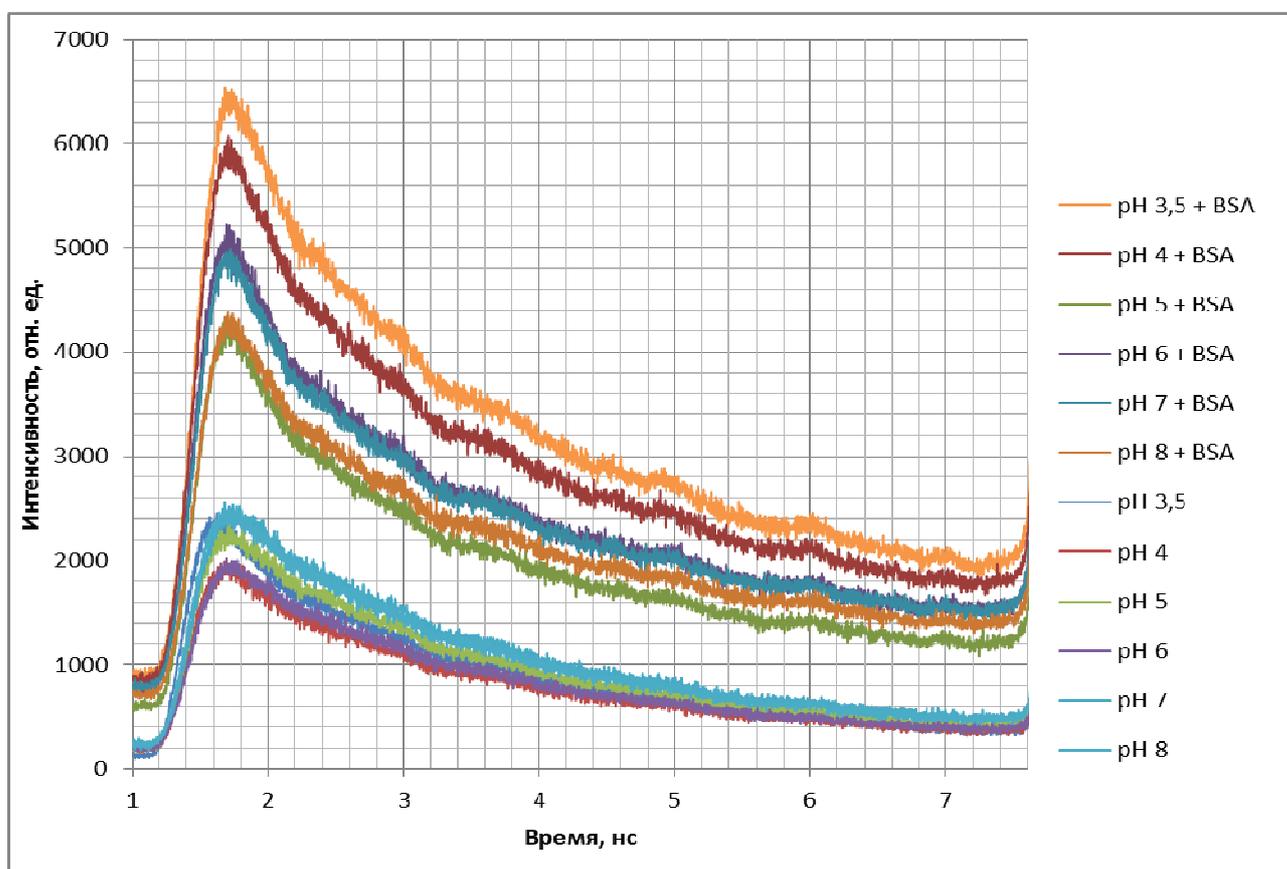


Рисунок 6. Кинетика затухания флуоресценции красителя К-35 при различных значениях рН(3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) в растворах с белком(рН 3,5; 4; 5; 6; 7; 8 + BSA) и без белка(рН 3,5; 4; 5; 6; 7; 8).

Из графиков видно, что интенсивность флуоресценции красителя в растворе с БСА в несколько раз выше, нежели в растворе без белка. При помощи программы SPCImage (Becker&Nickl) были обработаны зависимости интенсивностей красителя К-35 от времени, переведены в логарифмический масштаб (рисунок 7) и рассчитаны времена затухания этого наномаркера.

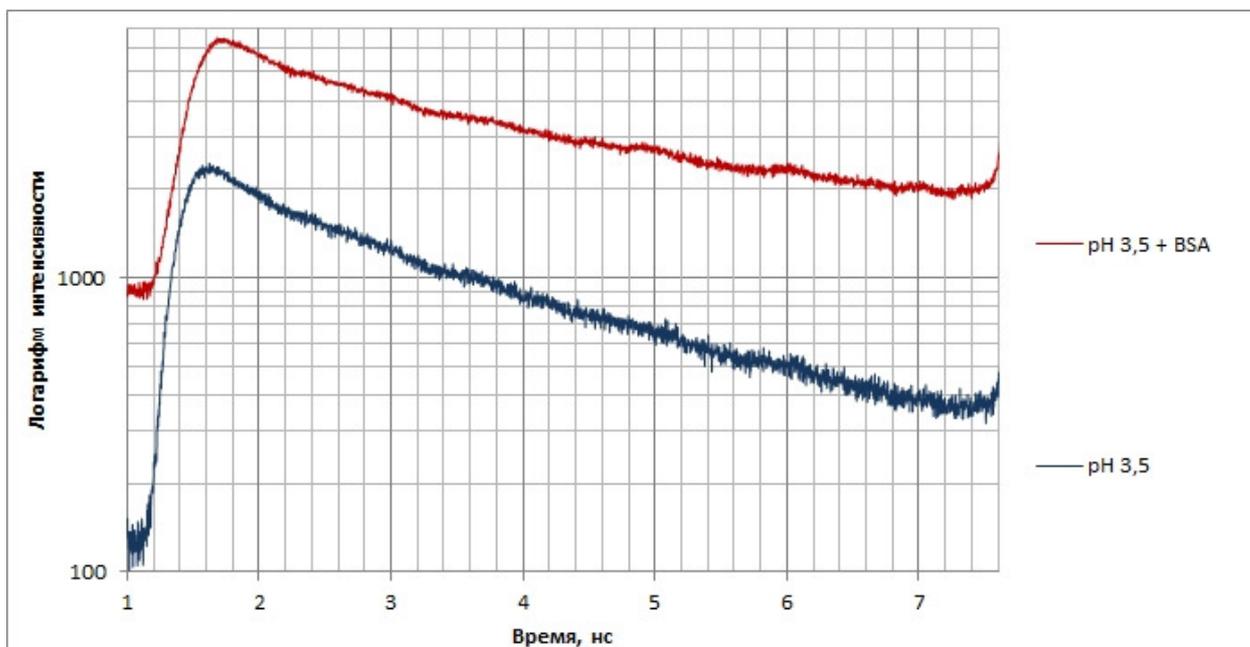


Рисунок 7 – Зависимость логарифма интенсивности К-35 от pH 3,5 в растворах с и без БСА

Наличие нескольких последовательных экспоненциальных зависимостей в верхних кривых (то есть кривых, отображающих затухание флуоресценции К-35 в растворе с БСА) указывает на то, что процесс затухания красителя К-35 в присутствии белка происходит иначе. В отличие от растворов без белка, для которых было получено только одно время затухания флуоресценции красителя, в растворах содержащих бычий сывороточный альбумин наблюдалось наличие трёх экспонент, что связано с тем фактом, что К-35 связывается с тремя связывающим сайтами БСА. Значения времени затухания флуоресценции К-35 отображены в таблицах 1 и 2.

рН	$\tau$ с БСА, нс					
	$\tau_1$	A1, %	$\tau_2$	A2, %	$\tau_3$	A3, %
3,5	0,538	18,7	2,034	47,2	6,910	34,2
4	0,496	27,9	2,036	41,0	6,897	31,2
5	0,479	22,7	1,948	52,6	6,948	24,5
6	0,572	29,1	2,029	48,2	6,986	22,8
7	0,458	21,5	2,013	50,1	6,945	27,6
8	0,398	22,7	1,846	47,8	6,777	29,6

*Таблица 1. Зависимость времени затухания флуоресценции красителя К-35 в растворах с БСА*

рН	$\tau_0$ без БСА, нс
3,5	3,475
4	3,472
5	3,452
6	3,436
7	3,413
8	3,390

*Таблица 2. Зависимость времени затухания флуоресценции красителя К-35 в растворах без БСА*

На рисунке 8 представлены зависимости времени затухания красителя К-35 при различных значениях рН буферного раствора, из них видно, что значение времени затухания маркера в растворах, не содержащих белок и с БСА, отличается, что обусловлено связыванием зонда с несколькими сайтами бычьего сывороточного альбумина. При этом были рассчитаны значения  $A_i$  (где  $i=1-3$ ), которые дают возможность оценить количество связавшихся с белком молекул флуоресцентного маркера К-35. Данные (Таблицы 1 и 2 и рисунок 8) показывают, что изменение времени затухания К-35 от рН (3,5 - 8) незначительно.

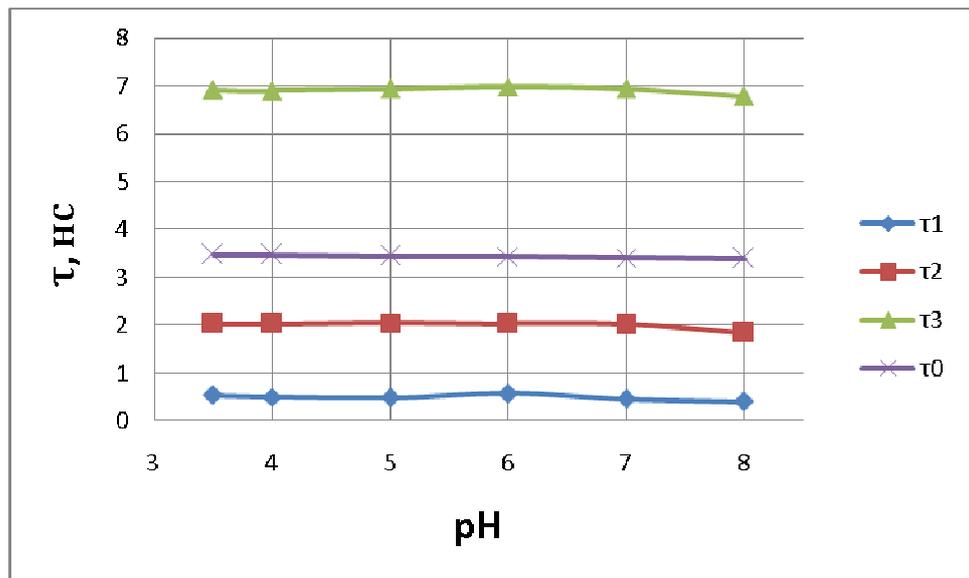


Рисунок 8 - Зависимость времени затухания K-35 от pH буфера в растворах с и без БСА

### §3.2. Исследование процессов взаимодействия бенгальского розового с белком

Для бенгальского розового также получены кривые зависимости интенсивности флуоресценции красителя как в растворах с БСА, так и в растворах без белка для различных значений рН от времени в пикосекундном диапазоне. Данные зависимости отображают процесс затухания флуоресценции красителя бенгальского розового и представлены на рисунке 9.

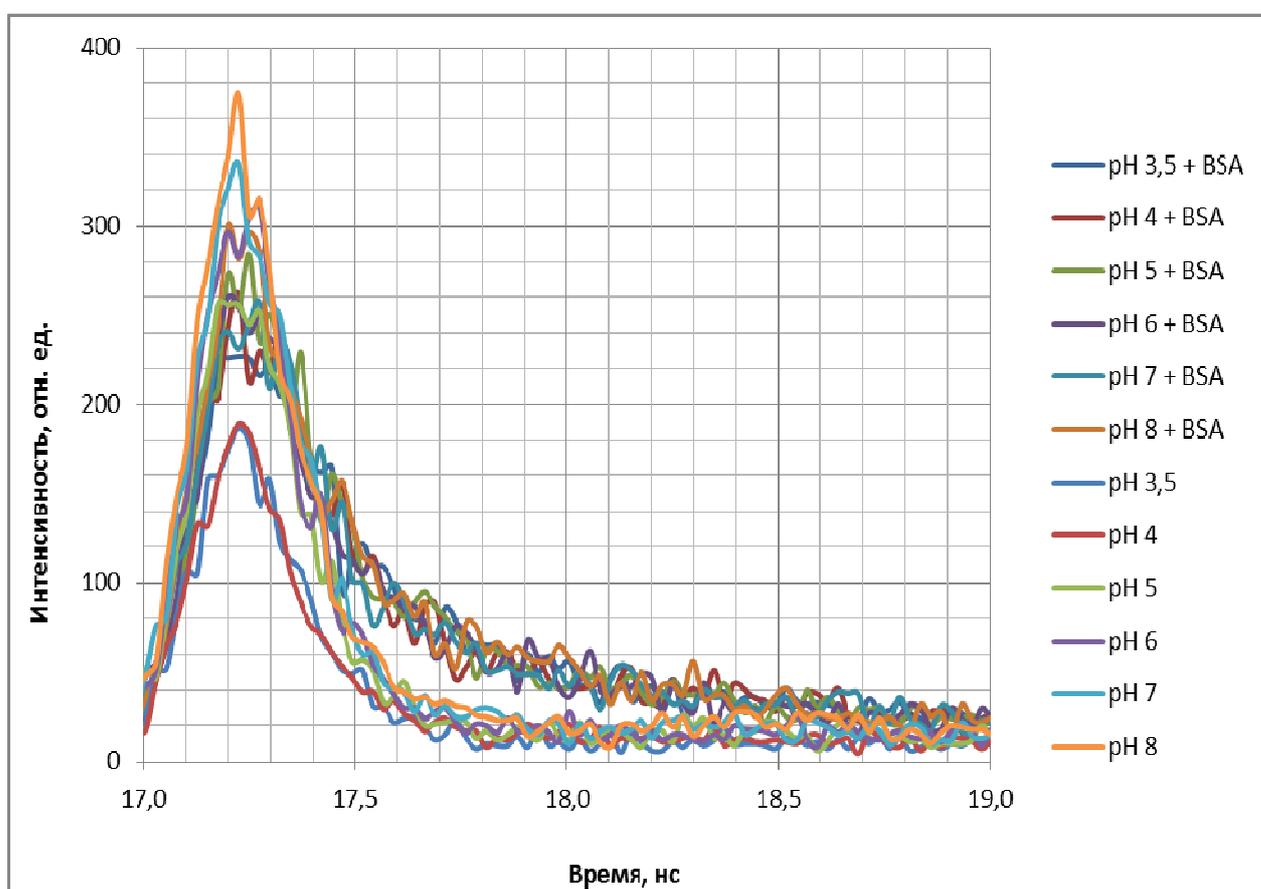


Рисунок 9. Кинетика затухания флуоресценции красителя бенгальского розового при различных значениях рН(3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) в растворах с белком(рН 3,5; 4; 5; 6; 7; 8 + BSA) и без белка(рН 3,5; 4; 5; 6; 7; 8).

Значения времени затухания флуоресценции бенгальского розового отображены в таблицах 3 и 4. В отличие от растворов без белка, для которых было получено только одно время затухания флуоресценции красителя, в растворах содержащих бычий сывороточный альбумин наблюдалось наличие двух экспонент, что говорит о связывании бенгальского розового с бычьим сывороточным альбумином. Полученные флуоресцентные характеристики данного маркера в растворах с белком ( $\tau_i$ , где  $i=1; 2$ ) свидетельствуют о его присоединении к одному связывающему центру белка.

рН	$\tau$ с БСА, нс			
	$\tau_1$	$A_4, \%$	$\tau_2$	$A_5, \%$
3,5	0,327	93,8	3,108	6,2
4	0,355	95,2	3,123	4,8
5	0,360	96,1	2,597	3,9
6	0,379	96,9	2,479	3,1
7	0,385	97,4	2,379	2,6
8	0,397	97,6	2,024	2,4

*Таблица 3. Зависимость времени затухания флуоресценции красителя бенгальского розового в растворах с БСА*

рН	$\tau_0$ без БСА, нс
3,5	0,325
4	0,350
5	0,359
6	0,380
7	0,384
8	0,398

Таблица 4. Зависимость времени затухания флуоресценции красителя бенгальского розового в растворах без БСА

На рисунке 10 представлены зависимости времени затухания флуоресцентного красителя бенгальского розового при различных значениях рН буферного раствора, из них видно, что значение времени затухания маркера меньше в растворах, не содержащих белок. Получено два времени затухания ( $\tau_1$ ;  $\tau_2$ ), одно из них ( $\tau_1$ ) сопоставимо с временем жизни бенгальского розового в растворе без белка ( $\tau_0$ ), то есть  $\tau_1$  характеризует молекулы красителя в растворе не присоединившиеся к белку, а  $\tau_2$  описывает молекулы наномаркера, связавшиеся с сывороточным альбумином. При связывании бенгальского розового с белком время жизни флуоресцентного маркера увеличивается.

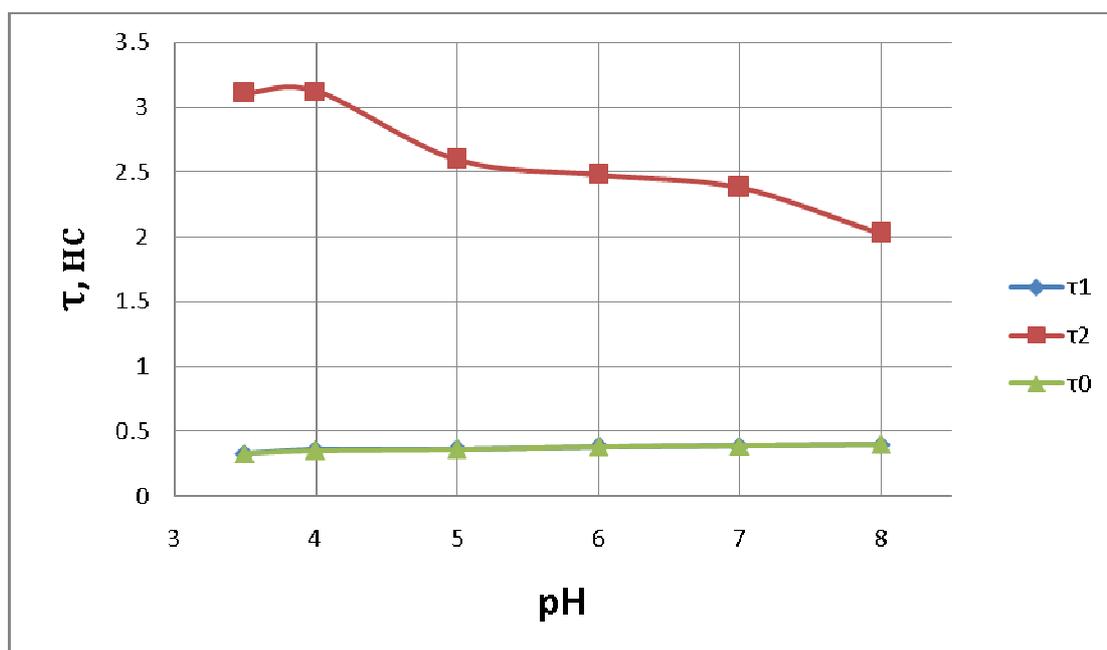


Рисунок 10 - Зависимость времени затухания бенгальского розового в растворах с и без БСА

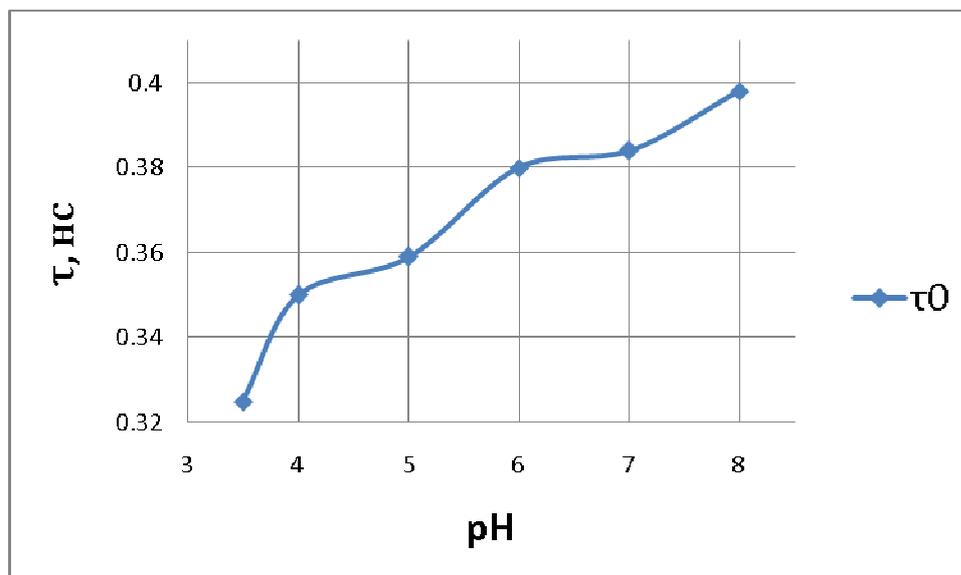


Рисунок 11 - Зависимость времени затухания бенгальского розового в растворах без БСА

Из таблицы 3 и исходя из данных по значениям  $A_i (i=4; 5)$  видно, что максимальное связывание красителя с белком происходит при рН, меньших 5,0, что объясняется взаимным соотношением зарядов белка и бенгальского розового. При этих рН белок в целом положительно заряжен, а краситель бенгальский розовый находится в отрицательно заряженной форме. При  $pH > 5,0$  отрицательно заряженные молекулы белка и бенгальского розового связываются хуже. Было выявлено (рисунок 11 и таблица 4), что с ростом рН время затухания красителя в растворах, не содержащих бычий сывороточный альбумин, возрастает. При рН, больших 4,0, молекулы бенгальского розового в среднем заряжены сильно отрицательно, имеет дианионную форму время жизни которой выше чем у моноанионной.

### §3.3. Сравнительный анализ процесса соединения двух красителей с бычьим сывороточным альбумином

По результатам данной работы видно, что функция затухания флуоресценции зонда К-35 может быть представлена в виде суммы трех экспонент:

$$F(t)=A_1e^{\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)} + A_2e^{\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)} + A_3e^{\left(-\frac{t}{\tau_3}\right)}; \quad (3.3.1)$$

функция затухания флуоресценции маркера бенгальского розового:

$$F(t)=A_1e^{\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)} + A_2e^{\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}; \quad (3.3.2)$$

Различие в количестве слагаемых функций (3.3.1 и 3.3.2) связано с количеством образовавшихся связей наномаркер-БСА. Значения  $\tau_i$  (где  $i=0;1;2;3$ ) данных красителей в растворах без белка и с белком говорят о том, что маркер К-35 соединяется с несколькими связывающими центрами бычьего сывороточного альбумина, а краситель бенгальский розовый с одним. Так как при сравнении значений  $\tau_i$  схожих с  $\tau_0$  для К-35 не было, а у бенгальского розового красителя совпало  $\tau_0$  с  $\tau_1$ . Величины амплитуд  $A_i$  пропорциональны числу молекул, флуоресцирующих с соответствующими им временами  $\tau_i$ . То есть возникает гетерогенность (после возбуждения флуоресцентных наномаркеров видно несколько типов флуоресцирующих молекул). Исходя из значений величин  $A_i$  (где  $i=1-6$ ) можно оценить количество связавшихся с БСА молекул красителя, а также сказать о влиянии рН (3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) на эффективность этой связи. При изучении наномаркера К-35 из-за соотношения зарядов белка и красителя (молекулы которого для рассматриваемого в данной работе диапазона рН находятся в положительно заряженной форме) наблюдались изменения значений  $A_i$  (где  $i=1-3$ ). Для бенгальского розового  $\tau_1 < \tau_2$ , так как  $\tau_1$  характеризовало

несвязанные с белком молекулы красителя, а  $\tau_2$ -молекулы, присоединившиеся к БСА, исходя из значений  $A_1$  и  $A_2$ , было выяснено, что соотношение зарядов белка и наномаркера имеют влияние на эффективность связывания.

## Основные результаты и выводы

1. Определены времена затухания флуоресценции красителей К-35 и бенгальского розового. Обнаружено, что бенгальский розовый связывается только с одним связывающим центром бычьего сывороточного альбумина, а К-35 с тремя.
2. Получены для исследуемых флуоресцентных маркеров процентные соотношения присоединившихся к белку молекул красителя.
3. Показано, что при добавлении в раствор красителей белка время затухания флуоресценции флуоресцентных маркеров ( $\tau_i$ ,  $i=0-3$ ) изменяется, а количество и значения  $\tau_i$  зависят от числа соединений наномаркер-бычий сывороточный альбумин.
4. Изучено влияние ионных растворов на эффективность связывания, которая объясняется соотношением зарядов БСА и молекул К-35 или бенгальского розового.

## Список цитируемой литературы

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

10. Volkova K.D., Kovalska V.B., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Kryvorotenko D.V., Yarmoluk S.M., Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes // *Dyes and Pigments*, 2007, v. 72, p. 285-292.
11. Volkova K.D., Kovalska V.B., Losytskyy M.Y., Reis L.V., Santos P.F., Almeida P., Lynch D.E., Yarmoluk S.M., Aza-substituted squaraines for the fluorescent detection of albumins // *Dyes and Pigments*, 2011, v. 90, p. 241-47.
12. Kitamura M., Murakami K., Yamada K., Kawai K., Kunishima M., Binding of sulforhodamine B to human serum albumin: A spectroscopic study // *Dyes and Pigments*, 2013, v. 99, p. 588-593.
13. Chen M., He X., Wangc K., He D., Yang X., Shi H., Inorganic fluorescent nanoprobe for cellular and subcellular imaging // *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, v. 58, p. 120-129
14. Bastiat G., Pritz C.O., Roider C., Fouchet F., Lignièrès E., Jesacher A., Glueckert R., Ritsch-Marte M., Schrott-Fischer A., Saulnier P., Benoit J., A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: A real challenge for fluorescence imaging // *Journal of Controlled Release*, 2013, v. 170, p. 334–342.
15. Tatikolov A.S., Costa S.M.B., Complexation of polymethine dyes with human serum albumin: a spectroscopic study // *Biophysical Chemistry*, 2004, v. 107, p. 33–49.
16. Dobretsov G., Polyak B., Smolina N., Babushkina T., Syreishchikova T., Klimova T., Sverbil V., Peregudov A., Gryzunov Y., Sarkisov O., Interaction of a fluorescent probe, CAPIDAN, with human serum albumin // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, v. 251, p. 134– 140.
17. Tatikolov A.S., Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2012, v. 13, p. 55-90.
18. Lindberg D.J., Wranne M.S., Gatty M.G., Westerlund F., Esbjorner E.K., Steady-state and time-resolved Thioflavin-T fluorescence can report on

- morphological differences in amyloid fibrils formed by Ab(1-40) and Ab(1-42) // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, v. 458, p. 418-423.
19. Veiksina S., Kopanchuk S., Rinken A., Fluorescence anisotropy assay for pharmacological characterization of ligand binding dynamics to melanocortin 4 receptors // *Analytical Biochemistry*, 2010, v. 402, p. 32-39.
20. Gerasov A., Shandura M., Kovtun Y., Losytsky M., Negrutka V., Dubey I., Fluorescent labeling of proteins with amine-specific 1,3,2-(2H)-dioxaborinopolymethine dye // *Analytical Biochemistry*, 2011, v. 420, p. 115-120.
21. Zadeh P.S.N., Mallak K.A., Carlsson N., Åkerman B., A fluorescence spectroscopy assay for real time monitoring of enzyme immobilization into mesoporous silica particles // *Analytical Biochemistry*, 2015, v. 476, p. 51-58.
22. Fernández-Sierra M., Quicones E., Assays for the determination of the activity of DNA nucleases based on the fluorometric properties of the YOYO dye // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, v. 570, p. 40-46.
23. Akimoto S., Teshigahara A., Yokono M., Mimuro M., Nagao R., Tomo T., Excitation relaxation dynamics and energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll a/c-protein complexes, probed by time-resolved fluorescence // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, v. 1837, p. 1514-1521.
24. Alveroglu E., Yavarinia N., Yilmaz Y., Kinetics of ZnO nanoparticle formation via fluorescence measurements // *Journal of Luminescence*, 2013, v. 143, p. 741-745.
25. Wang X., Zhang Z., Ma X., Wen J., Geng Z., Wang Z., Real-time fluorescence assays of alkaline phosphatase and ATP sulfurylase activities based on a novel PPI fluorescent probe // *Talanta*, 2015, v. 137, p. 156-160.
26. Chib R., Raut S., Shah S., Grobelna B., Akopova I., Rich R., Sørensen T.J., Laursen B.W., Grajek H., Gryczynski Z., Gryczynski I., Steady state and time resolved fluorescence studies of azadioxatriangulenium (ADOTA) fluorophore in silica and PVA thin films // *Dyes and Pigments*, 2015, v. 117, p. 16-23.

27. Ding F., Zhang L., Diao J., Xiu-NanLi, Ma L., Sun Y., Human serum albumin stability and toxicity of anthraquinone dye alizarin complexone: An albumin–dye model // *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, v. 79, p. 238-246.
28. VeetilS., BudisaN., JungG., Photostability of green and yellow fluorescent proteins with fluorinated chromophores, investigated by fluorescence correlation spectroscopy // *Biophysical Chemistry*, 2008, v. 136, p. 38-43.
29. FoninA.V., PovarovaO.I., StaianoM., D’AuriaS., TuroverovK.K., KuznetsovaI.M., The trehalose/maltose-binding protein as the sensitive element of a glucose biosensor // *Optical Materials*, 2014, v. 36, p. 1676-1679.
30. JaroszewiczL.R., MajchrowskiA., BrikM.G., AlZayedN., KuznikW., KitykI.V., KłosowiczS., Specific features of fluorescence kinetics of Pr<sup>+3</sup> doped BiB<sub>3</sub>O<sub>6</sub> glasses // *Journal of Alloys and Compounds*, 2012, v. 538, p. 220-223.
31. Viseua M.I., Tatikolovb A.S., Correiaa R.F., Costa S.M.B., Time evolution of monomers and aggregates of a polymethine dye probe the dynamics of model vesicles and micelles // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, v. 280, p. 54-62.
32. Bodis E., Raics K., Nyitrai M., Majer Z., Lukacs A., Fluorescence lifetime distributions report on protein destabilization in quenching experiments // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, v. 129, p. 108-114.
33. Wang G., Gao Y., Geng M.L., Analysis of heterogeneous fluorescence decays in proteins. Using fluorescence lifetime of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate to probe apomyoglobin unfolding at equilibrium // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, v. 1760, p. 1125-1137.
34. Zhang Q., Deng T., Li J., Xu W., Shen G., Yu R., Cyclodextrin supramolecular inclusion-enhanced vpyrene vexcimer switching for time-resolved fluorescence detection of biothiols in serum // *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, v. 68, p. 253-258.
35. RhodesA.A., Swartz B.L., Hosler E.R., Snyder D.L., Benitez K.M., Chohan B.S., Basu S., Static quenching of tryptophan fluorescence in proteins by

adioxomolybdenum(VI) thiolate complex // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2014, v. 293, p. 81-87.

36. Mora A.K., Murudkar S., Singh P.K., Nath S., Effect of fibrillation on the excited state dynamics of tryptophan in serum protein – A time-resolved fluorescence study // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2015, v. 299, p. 73-79.

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