

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**Исследование взаимодействия наночастиц с молекулами белков и
красителей спектрально-люминесцентными методами**

Выполнил студент
405 группы:
Давыдов Федор Дмитриевича

подпись студента

Научный руководитель:
Кулешова Анна Александровна, ассистент
кафедры общей физики физического
факультета МГУ, кандидат физ.-мат. наук

подпись научного руководителя

Допущен к защите
Заведующий кафедрой общей физики
профессор А.М. Салецкий

подпись зав. кафедрой

Москва-2021

Оглавление

Введение.....	3
ГЛАВА 1	5
1.1 Физические основы флуоресцентной спектроскопии.	5
1.2 Спектры флуоресценции	12
1.3 Механизмы тушения флуоресценции. Динамическое и статическое тушение. Метод Штерна - Фольмера.....	13
1.4 Метод Бенези – Хильдебранда.....	15
1.5 Бычий сывороточный альбумин.	16
1.6 Красители семейства флуоресцеина (бенгальский розовый).....	18
1.7 Метод динамического рассеивания света	19
1.8 Применение наночастиц металлов и флуоресцентных красителей в исследовании изменения пространственной структуры белка.	21
ГЛАВА 2 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТА	29
2.1 Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина для изучения его флуоресцентных характеристик в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра.	29
2.2 Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина для изучения изменения его диаметра в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра.	30
2.3 Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения флуоресцентных характеристик и констант тушения флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра	31
2.3 Методика экспериментов на корреляционном спектрографе для изучения динамики изменения размеров бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра.....	32
ГЛАВА 3.	34
3.1 Спектры люминесценции.	34
3.2 Спектры поляризованной люминесценции.	38
3.3 Спектры поглощения	38
3.4 Размеры частиц.....	41
3.5 Синхронные спектры люминесценции	43
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46

Введение

В настоящее время процесс изменения пространственной структуры белка вызывает большой интерес в различных областях медицины, фармацевтики, биофизики. Для изучения изменения пространственной структуры белка используется ряд методов. Спектроскопический метод, включающий в себя анализ спектров флуоресценции, поляризованной флуоресценции, синхронных спектров и спектров поглощения, позволяет исследовать строение бычьего сывороточного альбумина, находящегося в нативной форме и претерпевающего различные структурные изменения вследствие взаимодействия с внешними факторами.

В данной работе изучены изменения спектрально-люминесцентных характеристик белка и красителя при связывании с наночастицами серебра(SNP) при различных рН среды. В качестве белка использовался бычий сывороточный альбумин (БСА), потому что на его на структуру существенно влияет рН. Так было установлено, что при изменении рН от 4,0 до 3,5 структура БСА разворачивалась, ослабляя межмолекулярное взаимодействие. рН влияет и на вторичную структуру БСА: относительные содержания α -спиралей и β -слоев не изменяются при снижении рН с 7,0 до 4,0. В области $3,5 < \text{pH} < 4,0$ при увеличении рН относительное содержание α -спирали значительно уменьшается. Кроме того, рН изменяло гидрофобность БСА. В качестве флуоресцентных маркеров использовался краситель бенгальский розовый, который при различных рН существует в разных формах: дианионной форме в основном растворителе, при уменьшении рН в анионной, в нейтральной в виде трех таутомеров. В качестве наночастиц использовались наночастицы серебра с диаметром 12 нм.

Было показано, что зависимости максимума спектра флуоресценции БСА λ_{max} и ее интенсивности в максимуме спектра I_{max} от рН раствора имеют S – образный вид: в области $4,0 < \text{pH} < 6,0$ наблюдается длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции и значительный рост ее интенсивности, при $6,0 < \text{pH} < 8,0$ и $3,5 < \text{pH} < 4,0$ λ_{max} и I_{rel} практически не изменяются. Эти изменения λ_{m}

предполагают, что сдвиг положения максимумов был вызван изменением локального микроокружения, полярности, структурной конформации и внутреннего переноса заряда вокруг поверхности остатка триптофана.

Для оценки микроокружения БСА использовались синхронные спектры флуоресценции (ССФ) БСА. При установке $\Delta\lambda$ на 15 и 60 нм синхронные спектры флуоресценции БСА позволяли получить информацию об остатках тирозина (Tyr) и триптофана (Trp) соответственно. Установлено, что с ростом pH с 3,5 до 5,0 наблюдается увеличение относительного содержания Trp в БСА, при дальнейшем увеличении pH отношение Trp и Tyr не меняется. При добавление в растворы наночастиц серебра наблюдается уменьшение отношения Trp и Tyr во всей области pH.

При добавление в растворы БСА наночастиц серебра наблюдается тушение флуоресценции БСА, которое происходит из-за связывания между БСА и частицами серебра.

ГЛАВА 1

1.1 Физические основы флуоресцентной спектроскопии

Люминесценция - явление, подразумевающее под собой свечение вещества. Для возбуждения люминесценции необходимо передать энергию молекулам вещества, чтобы перевести их из основного электронного состояния в возбужденное. Обратный переход (т.е. из возбужденного в основное состояние), вызывающий свечение, называется люминесценцией.

Люминесценция разделяется на множество видов (фотолюминесценция, катодолюминесценция, рентгенолюминесценция и т.д.) в зависимости от способа ее возбуждения, но стоит рассмотреть подробнее фотолюминесценцию.

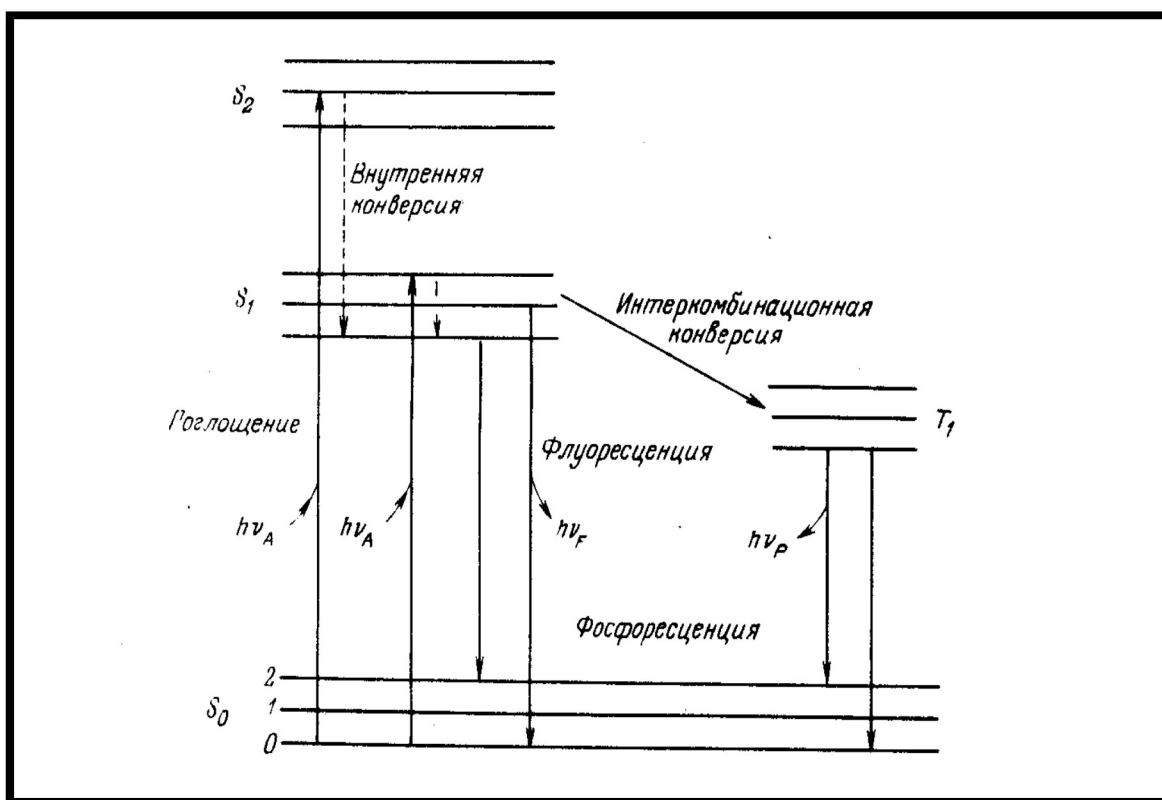


Рис. 1.1 Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы. Стрелками обозначены основные процессы преобразования энергии фотовозбуждения в молекуле

Фотолюминесценция – вид люминесценции, чей отличительной чертой является возбуждение с помощью электромагнитного излучения оптической частоты. Она же (фотолюминесценция) также делится на два

типа: флуоресценцию и фосфоресценцию в зависимости от природы возбужденного электронного состояния и времени свечения. Под флуоресценцией понимается свечение, которое затухает практически мгновенно ($\sim 10^{-9}$ сек). Данное явление возникает при переходе между энергетическими уровнями одинаковой мультиплетности (при переходах с первого S_1 , или реже – с второго возбужденного синглетного уровня S_2 , на основной синглетный уровень S_0). Столь непродолжительное «послесвечение» связано с коротким временем жизни молекулы в синглетном возбужденном состоянии и высокой вероятностью перехода частиц в основное состояние. В то время как фосфоресценцией считается свечение, возникающее при переходах между энергетическими уровнями различной мультиплетности (при переходах с первого триплетного T_1 на основной синглетный уровень S_0) и продолжающееся сравнительно долгий промежуток времени после прекращения возбуждения, а, как следствие, заметный для человеческого глаза ($> 10^{-6}$ сек). Данное явление обуславливается достаточно продолжительным временем жизни триплетного состояния и крайне малой вероятностью подобного перехода, все вышеизложенные факторы приводят к тому, что константа свечения фосфоресценции крайне мала, а как следствие свечение в данном случае длится гораздо дольше, чем при флуоресценции (рис. 1.1).

Также возможны безызлучательные переходы. В случае, если подобный переход происходит между электронными уровнями разной мультиплетности, то данное явление принято называть интеркомбинационной конверсией. Если безызлучательный переход происходит между электронными состояниями одинаковой мультиплетности, то такой переход называют внутренней конверсией (рис. 1.1).

Явление флуоресценции характеризуется рядом понятий. Спектром поглощения вещества называется зависимость коэффициента экстинкции ϵ (характеризующий то, как сильно вещество поглощает свет при

выбранной длине волны) от длины волны λ (или от волнового числа ν). Спектр возбуждения – это функция распределения излучаемой веществом энергии в зависимости от длины волны (или частоты) возбуждения. Понятие спектра люминесценции подразумевает под собой функцию распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн или частотам.

Молекулярная люминесценция обладает достаточно важной закономерностью, проявляющейся во взаимном расположении спектров люминесценции и поглощения. Достаточно долгое время данная зависимость описывалась правилом Стокса, которое гласит, что частота возбуждающего света больше или равна частоте люминесценции:

$$\nu_{\text{возб}} \geq \nu_{\text{люм.}}$$

Однако, стоит отметить, что данное утверждение абсолютно верно исключительно для атомов и простых молекул, находящихся в газообразном состоянии, которые в силу того, что для них выполняется закон Стокса, называются стоксовыми. В свою очередь, вещества, для которых не выполнялось правило Стокса, получили название антистоксовых. Впоследствии Ломмель предложил более широкую формулировку: спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн. Данная зависимость, названная законом Стокса – Ломмеля может быть записана в следующем виде:

$$h\nu_{\text{возб макс.}} > h\nu_{\text{люм. макс.}}$$

В таком виде он (закон), верен для большинства люминесцирующих веществ.

Фотолюминесценция возникает вследствие поглощения энергии возбуждающего света, очевидно, что не вся эта энергия превращается в энергию люминесценции. Чтобы оценить эффективность данного процесса, было введено понятие выхода люминесценции. Существует квантовый и энергетический выход люминесценции. Энергетическим

выходом люминесценции называется отношение энергии, испускаемой в виде люминесценции $E_{л}$, к энергии поглощенного возбуждающего света $E_{п}$:

$$B_{эН} = E_{л}/E_{п}.$$

Квантовым выходом люминесценции называется отношение числа испущенных квантов люминесценции $N_{л}$ к числу квантов возбуждающего света $N_{п}$:

$$B_{кв} = N_{л}/N_{п}.$$

Между этими двумя величинами существует зависимость, которая легко выражается, зная, что энергия кванта равна $h\nu$, можем получить следующее выражение:

$$B_{эН} = (N_{л}/N_{п})(h\nu_{л}/h\nu_{п}) = B_{кв}(\nu_{л.ср.}/\nu_{п.ср.}),$$

где $\nu_{л.ср}$ и $\nu_{п.ср.}$ – средние эффективные частоты излучаемого и поглощаемого света, h – постоянная Планка. Так как $\nu_{л.ср.} < \nu_{п.ср.}$, то

$$B_{эН} < B_{кв}.$$

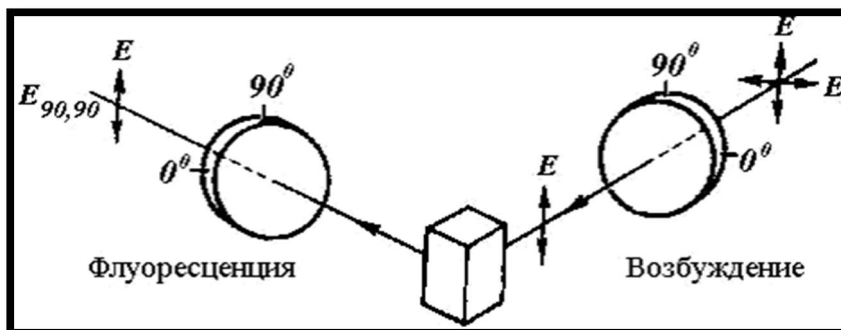


Рис. 1.2 Схема измерения поляризованной флуоресценции.

С. И. Вавилов показал, что энергетический выход люминесценции растворов органических веществ $\sim 0,8$. В этом случае $B_{кв}$ будет близко к единице. При данных параметрах часть энергии возбуждения в подавляющем большинстве случаев будет расходоваться на развитие безызлучательных переходов. Эти энергетические потери принято именовать стоковскими.

По причине того, что частицы люминесцирующих веществ оптически анизотропные, люминесцентное излучение каждой такой частицы

частично поляризовано. Стоит заметить, что, если анизотропные молекулы ориентированы хаотично, как у большинства сложных органических соединений, то вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция, как следствие, - неполяризованным. Таким образом, для возникновения поляризации люминесценции необходима анизотропия ориентационного распределения излучателей, которая может быть обусловлена как внутренними (например, кристаллами или пленками красителей), так и внешними факторами (путем воздействия луча на вещество) (рис. 1.2).

Интенсивность люминесценции в произвольном направлении можно представить в виде суммы двух световых потоков $I_{||}$ и I_{\perp} , поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям.

Стоит отметить, что при возбуждении поляризованным светом электрический вектор преимущественно сонаправлен с направлением возбуждающего света. Кроме того, если возбуждающим светом облучается совокупность молекул, а их дипольные моменты параллельны друг другу, то их люминесценция будет полностью поляризована. По этой причине вводятся понятия степени поляризации и степени анизотропии как мера поляризации люминесценции.

Степень поляризации люминесценции – количественная оценка поляризованной люминесценции, представляемая в виде:

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

где $I_{||}$ и I_{\perp} – соответственно параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции. Позже было введено понятие степени анизотропии излучения:

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

Стоит отметить основное различие данных характеристик. Оно

заключается в том, что в отличие от степени поляризации, у которой в знаменателе стоит значение интенсивности люминесценции в заданном направлении, в знаменателе степени анизотропии используется величина пропорциональная суммарному значению интенсивности, а как следствие, она дает более корректное представление при описании процессов поляризованной люминесценции.

Также между этими двумя характеристиками существует достаточно простая зависимость:

$$r = 2P / (3 - P) \text{ или } P = 3r / (2 + r)$$

Количественная теория вращательной деполяризации была продолжена В. Л. Левшиным, а затем и Перреном с использованием модели вращательной диффузии в случае сферически-симметричных молекул.

В общем случае степень анизотропии в любой момент времени представляется следующим выражением:

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

При $t=0$ и r_0 (предельная анизотропия излучения) степень анизотропии определяется по формуле Левшина – Перрена:

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

А. Яблонским было показано, что $r(t)$ описывается экспоненциальной функцией:

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

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

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

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

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

где T – абсолютная температура, η - вязкость раствора, V – объем раствора, k – постоянная Больцмана. Учитывая эту формулу закон затухания люминесценции примет следующий вид:

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

Или в обозначениях степени поляризации получим:

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

где P_0 – предельная степень поляризации люминесценции. Данная зависимость получила название формулы Левшина – Перрена. Она установила линейную связь между величинами $1/P$ и T/η . Откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона ϕ этой прямой к оси абсцисс:

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

При фиксированном значении τ_0 данное выражение позволяет определить величину молекулярного объёма. Также, как не трудно заметить, зная значение угла наклона ϕ этой прямой к оси абсцисс, можно установить среднее время жизни возбужденного состояния исследуемых молекул [1-3].

1.2 Спектры флуоресценции

В основу метода флуоресцентной спектроскопии входит рассмотрение различного рода спектров. Спектры поглощения, подразумевают под собой зависимость коэффициента экстинкции \mathcal{E} от длины волны (или от волнового числа ν). Спектры поглощения позволяют проводить качественный и количественный анализ рассматриваемого вещества. Заметим, что вид спектра поглощения зависит от множества факторов, таких как агрегатное состояние исследуемого вещества или природы образующих его молекул. Соотношение между спектрами поглощения и люминесценции было установлено Б.И. Степановым, которое имеет следующий вид:

$$I_\nu / \alpha_\nu = D(T) \nu^3 \exp(-h\nu/kT),$$

где I_ν -мощность люминесценции на частоте ν , α_ν -коэффициент поглощения на частоте ν , $D(T)$ -постоянная, зависящая от температуры T , k - постоянная Больцмана, h -постоянная Планка. Также данное соотношение представимо в логарифмическом виде, которое более удобно для проверки экспериментальных данных:

$$\ln(I_\nu / \alpha_\nu) - 3 \ln \nu = \text{const} - (h\nu/kT) = F$$

Спектр флуоресценции – это функция распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн или частотам. Важно отметить одну из основных закономерностей молекулярной люминесценции, заключающейся в независимости спектра люминесценции от длины волны возбуждающего излучения. Интенсивность излучаемого молекулами света зависит от вероятности перехода, величины излучаемого кванта и числа возбужденных молекул, находящихся на исходном уровне. Рассмотрим следующее выражение:

$$I_{\text{исп}} = nh\nu_{\text{исп}} \int \rho(E_{\text{кол}}^*) f(E_{\text{кол}}^*, \nu) dE_{\text{кол}}^*,$$

где $E_{\text{кол}}^*$ – энергия колебательного подуровня верхнего электронного состояния, $f(E_{\text{кол}}^*, \nu)$ - вероятность перехода на высшее энергетическое состояние. Итак, в этом уравнении функции $\rho(E_{\text{кол}}^*)$ и $f(E_{\text{кол}}^*, \nu)$ не зависят от

частоты возбуждающего света, а определяются только внутренними параметрами системы, а, следовательно, и интенсивность флуоресценции также не зависит от частоты возбуждающего излучения.

Зависимость степени поляризации от частоты волны возбуждения при фиксированной длине испускания была названа С. И. Вавиловым поляризованным спектром. Спектры поляризации крайне полезны при исследовании структуры молекул. С их помощью может быть установлено относительное расположение осцилляторов поглощения и люминесценции в молекуле. Измеряя степень поляризации флуоресценции при ее возбуждении в различных областях поглощения, используя формулу Левшина-Перрена, можно определить величину угла α , определяющего относительное расположение осцилляторов поглощения и люминесценции. Также с их помощью можно установить абсолютную ориентацию поглощающих осцилляторов относительно осей молекул, которая связана с цветностью рассматриваемого вещества.

Синхронные спектры – это спектры, получающиеся в результате сканирования рассматриваемого вещества двумя монохроматорами, таким образом, что разница между длиной волны возбуждения и длиной волны регистрации остается неизменной. Суть метода синхронной спектроскопии заключается в следующем. Если при регистрации спектра флуоресценции смеси люминофоров синхронно с изменением длины волны флуоресценции менять длину волны возбуждения флуоресценции, поддерживая постоянной определенную разность между ними, то можно получить спектр, состоящий из отдельных пиков — синхронный спектр флуоресценции. Пики появляются в той области длин волн, где спектры возбуждения и флуоресценции перекрываются. Важно отметить, что синхронные спектры флуоресценции могут давать информацию об остатках тирозина и триптофана в белках [1-3].

1.3 Механизмы тушения флуоресценции. Динамическое и статическое тушение. Метод Штерна - Фольмера

Различные внутри- и межмолекулярные взаимодействия обычно приводят к уменьшению выхода люминесценции исследуемых веществ, что, в

свою очередь, приводит к тушению свечения исследуемых веществ. Известно большое число видов процессов тушения люминесценции, отличающихся по природе своего взаимодействия. Например, температурное тушение, тушение посторонними примесями, концентрационное тушение и др.

Для характеристики процессов тушения была введена классификация, разделяющая все виды тушения люминесценции на 2 типа. Тушением первого рода названы процессы, в которых выход люминесценции уменьшается при воздействиях на невозбужденные молекулы вещества (такой тип тушения также принято называть статическим). Под тушением второго рода понимается процессы, в которых выход люминесценции уменьшается при воздействии на возбужденные молекулы вещества.

При тушении люминесценции первого рода средняя длительность возбужденного состояния молекул τ сохраняется постоянной, так как в возбужденное состояние переходят лишь те молекулы, которые избежали внешних воздействий. При тушении второго рода из-за воздействия на возбужденные молекулы вещества τ изменяется.

Многие посторонние примеси, добавляемые к растворам люминесцирующих соединений, приводят к развитию тушения люминесценции. Этот вид тушения люминесценции наблюдается у газов, жидкостей и твердых тел.

Рассмотрим тушение, связанное со случайными столкновениями между молекулами флуоресцирующего вещества и молекулами тушителя. Его кинетика характеризуется формулой Штерна – Фольмера:

$$V_0/V = 1 + K_d C_T,$$

где K_d – константа динамического тушения, C_T – концентрация тушителя, V_0 и V – выход люминесценции в отсутствие и при наличии тушения соответственно.

Статическое тушение связано с образованием не флуоресцирующих комплексов в основном состоянии. Статическое тушение также описывается уравнением типа Штерна-Фольмера, но константа тушения представляет

собой константу равновесия образованного комплекса.

$$B_0/B = 1 + K_{CT}C_T,$$

где K_{CT} – константа равновесия образованного комплекса [1-3].

1.4 Метод Бенези – Хильдебранда

Метод Бенези – Хильдебранда – это математический метод, использующийся в физической химии при анализе спектров поглощения для определения константы ассоциации K_{app} , являющейся показателем ассоциативности рассматриваемых смесей.

Рассмотрим следующую равновесную систему:



где А и В два каких-либо ассоциирующих вещества. K_{app} может быть вычислено при помощи следующего выражения:

$$A_{obs} = (1 - \alpha)C_0\varepsilon_A l + \alpha C_0\varepsilon_B l, \quad (1)$$

где A_{obs} – значение спектра поглощения в своем пике для смеси А и В, C_0 – начальная концентрация вещества А, α -угол взаимной ассоциации веществ А и В, ε_A и ε_B - коэффициенты молярной экстинкции вещества А и В соответственно. l – длина оптического пути, для упрощения взятая за единицу.

Уравнение (1) также представимо в следующем виде:

$$A_{obs} = (1 - \alpha)A_0 + \alpha A_C, \quad (2)$$

где A_0 и A_C – это значения пиков спектров поглощения веществ А и В при C_0 .

Зная, что:

$$\alpha = \frac{K_{app}[B]}{1 + K_{app}[B]},$$

где $[B]$ – концентрация вещества В, мы можем представить уравнение 2 в следующем виде:

$$\frac{1}{A_{obs} - A_0} = \frac{1}{A_C - A_0} + \frac{1}{K_{app}[B](A_C - A_0)}, \quad (3)$$

как несложно заметить, уравнение 3 легко аппроксимируется графиком

зависимости $\frac{1}{A_{obs}-A_0}$ от $\frac{1}{[Q]}$, в этом случае $\frac{1}{K_{app}(A_C-A_0)}$ будет являться

коэффициентом угла наклона прямой, а $\frac{1}{A_C - A_0}$ будет являться точкой пересечения прямой с осью ординат. Зная их, несложно вычислить K_{app} .

1.5 Бычий сывороточный альбумин

Бычий сывороточный альбумин (БСА) - глобулярный белок семейства сывороточных альбуминов (составляющие до 70% от всех белков в плазме крови), к этому семейству также относится сывороточный белок человека (САЧ). Следует упомянуть несколько важных характеристик для БСА: значение изоэлектрической точки pI (то есть величина pH , при котором белок в целом электрически нейтрален) для БСА равно 4,9 молекулярная масса БСА равна 64 кДа.

Сывороточный альбумин (СА) составляет большую часть от всех белков плазмы крови организма. Он продуцируется в печени и выполняет ряд важных физиологических функций, а именно поддержание коллоидно-осмотического давления и перенос физиологических метаболитов (обладает способностью связываться с низкомолекулярными соединениями). В плазме крови существует несколько белков, осуществляющих транспортную функцию, но только сывороточный альбумин способен присоединять обратимо такой широкий круг лигандов. Последняя из вышеперечисленных функций СА представляет особый интерес по причине осуществления переноса не только продуктов жизнедеятельности организма, например, билирубина, уробилина, 23 желчных элементов, но и ядов, и лекарств (некоторые виды антибиотиков, пенициллин, гормоны, сульфаниламид, варфарин, фенитоин, и др.).

Как и любой белок семейства альбуминов, БСА состоит из аминокислотных остатков. Первичная структура СА определяется единственной полипептидной цепью каждого белка. Она состоит из 582 для БСА аминокислотных остатков. Важно отметить, что при изучении и сопоставлении БСА и САЧ [5] было обнаружено около 75% совпадение, то есть бычий сывороточный альбумин и человеческий СА имеют схожую

способностью к присоединению разных лигандов, что делает использование БСА подходящим предметом изучения для медицинских исследований. Вторичная структура БСА включает в себя по большей части α -спиральные участки и участки хаотической укладки при физиологическом значении pH (7,4), но также присутствуют β складчатые структуры.

Третичная структура БСА определяется тремя гомологичными доменами, каждый из которых состоит из двух субдоменов. БСА в водном растворе при физиологических условиях имеет образ схожий с видом сердца (рис. 1.3) и можно сравнить форму сывороточного альбумина с правильной треугольной призмой (со стороной основания длиной 8 нм и с высотой – 3 нм). БСА имеет в своей аминокислотной цепи два остатка триптофана – Trp 135 и Trp 214.

За транспорт разных структурных классов лигандов молекулой СА отвечают различные специфичные центры связывания. В частности, есть шесть главных связывающих центров САЧ: центр I и II – для связывания малых органических молекул, центры III и IV – для длинноцепочечных жирных кислот, центр V – для лигандов со свободной SH-группой, центр VI – для связывания ионов металлов. Некоторые реакции связывания происходят благодаря электростатическим взаимодействиям, другие, провоцируя химические модификации боковых радикалов аминокислотных остатков, носят ковалентный характер [4].

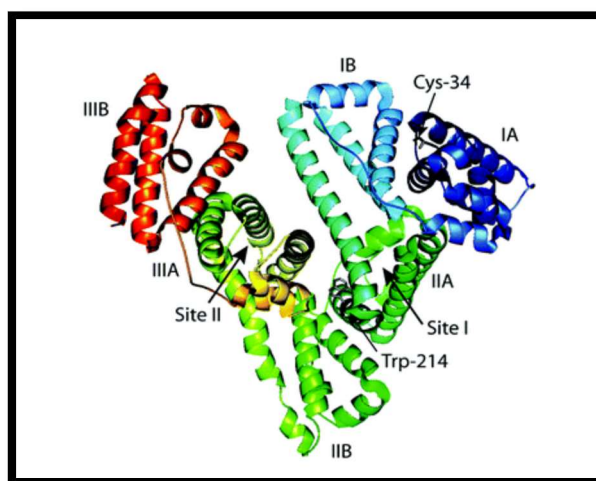


Рис. 1.3 Доменная структура сывороточного альбумина

1.6 Красители семейства флуоресцеина (бенгальский розовый)

Флуоресцирующие наномаркеры (красители, маркеры, зонды) имеют широкое применение в биофизике, медицине, биологии, фармакологии, химии. Флуоресцентным зондом называют флуоресцирующее вещество, которое при добавлении в раствор с биологическими объектами (мембранами, белками, липопротеинами, клетками и т.п.) связывается с ними. По данным флуоресценции зонда в биологической системе получают информацию о структуре, конформационных изменениях и функциях биологических объектов.

Использование флуоресцентных зондов в исследованиях белковых макромолекул дает большую информацию о строении белковых молекул и о физико-химическом состоянии отдельных участков (сайтов) на белковых макромолекулах. Флуоресцентные молекулярные зонды тонко чувствуют изменения своего окружения и являются высокочувствительными датчиками изменений, происходящих с белковыми молекулами. Процесс связывания лигандов с сывороточным альбумином обусловлен наличием на белке так называемых связывающих центров.

Для исследования I связывающего центра сывороточных альбуминов используются анионные при физиологическом рН 7,4 флуоресцентные наномаркеры семейства флуоресцеина (флуоресцеин (Ф), эозин (Э), эритрозин (Эр), бенгальский розовый (БР)), соединяющиеся непосредственно с ним. Структурные формулы данных флуоресцентных зондов представлены ниже на Ф и его производные являются флуороновыми красителями, которые принадлежат классу ксантеновых флуорофоров (главным структурным элементом у них является ксантеновый трицикл).

Своей популярностью флуоресцеин обязан тому факту, что квантовый выход флуоресценции его дианионной формы молекулы близок к единице. То есть безызлучательные переходы с S_1 на S_0 и T почти не происходят.

Для флуоресцентного зонда БР $pK(OH) = 2,6$, $pK(COOH) = 4,0$. При $pH < 2,6$ БР электрически нейтрален, в области $2,6 < pH < 4,0$ он находится в

слабо отрицательно заряженной форме и является моноанионом, при $pH > 4,0$ этот наномаркер является дианионом и сильно отрицательно заряжен [4].

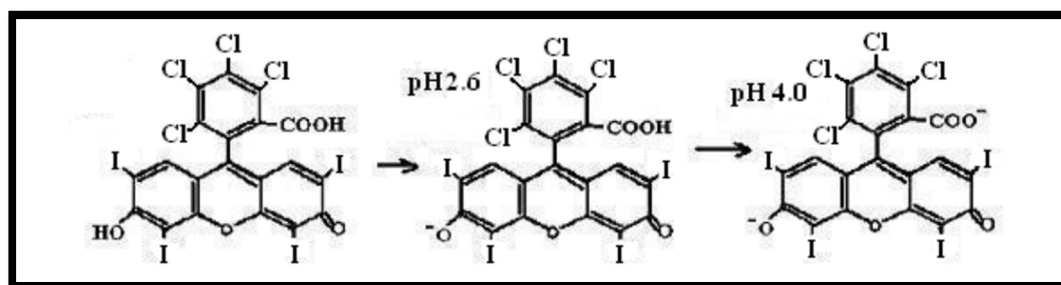


Рис. 1.4 Структурная формула бенгальского розового и значения pK ионизированных групп

1.7 Метод динамического рассеивания света

Метод динамического рассеивания света относится к классу обратных задач. Данный метод основывается на анализе временной автокорреляционной функции флуктуации рассеянного света для изучения структуры и динамики газообразных и жидких сред.

Рассмотрим растворенные в жидкости частицы. Дисперсные частицы совершают броуновское движение. Это приводит к локальным флуктуациям концентрации раствора. В свою очередь, данные флуктуации влекут за собой локальные неоднородности показателя преломления среды. При прохождении через раствор лазерный луч будет частично рассеиваться в местах неоднородности. Таким образом, флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать локальным флуктуациям концентрации частиц.

Мерой корреляции флуктуации интенсивности является автокорреляционная функция, которая имеет следующий вид:

$$G^2(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t - \tau) \delta\tau,$$

где I – интенсивность падающего света в момент времени t , τ – время релаксации. Стоит отметить, что при $\tau = 0$ функция будет достигать своего максимального значения, а при $\tau \rightarrow \infty$ она достигнет своего минимума, вследствие чего, интенсивности рассеяния будут некоррелированы.

Рассмотрим простейший случай, когда все молекулы в растворе имеют

сферическую форму. Тогда, нормированная корреляционная функция будет иметь вид:

$$G(\tau) = a \exp\left(-\frac{2\tau}{t_c}\right) + b,$$

где a и b – экспериментальные константы, которые могут быть найдены путем аппроксимации экспериментально полученной корреляционной функции теоритической экспоненциальной функцией.

Для сложных растворов, содержащих частицы различных размеров корреляционная функция рассеянного излучения представима с следующим виде:

$$G(\tau) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_i}\right).$$

Уравнение диффузии:

$$\frac{\delta c(\vec{r}, t)}{\delta t} = D \Delta(\vec{r}, t),$$

где D – коэффициент диффузии.

Решение уравнения диффузии:

$$\frac{1}{t_c} = D_t q^2.$$

Стоит заметить, что время корреляции обратно пропорционально коэффициенту диффузии и волновому вектору флуктуации концентрации q :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right),$$

где n – это показатель преломления жидкости, в которой взвешены частицы рассматриваемого вещества, θ – угол рассеяния и λ – длина волны лазерного света. (рис 1.5)

Волновой вектор флуктуации концентрации q представляет собой разность между вектором падающей волны \vec{k} и волнового вектора рассеивающей световой волны \vec{k}' , причем $|\vec{k}| \approx |\vec{k}'| = \frac{2\pi n}{\lambda}$, а $|q| = 2|k| \sin \frac{\theta}{2}$ (рис 1.5).

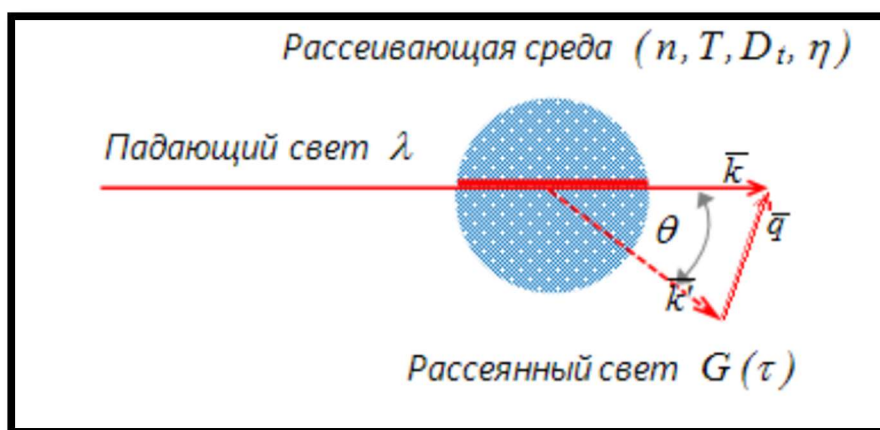


Рис 1.5 Схема процесса рассеяния света

Зная коэффициент диффузии D и используя формулу Стокса-Эйнштейна можно найти гидродинамический радиус R_h :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} ,$$

где k_B – константа Больцмана, T – абсолютная температура и η – сдвиговая вязкость среды в которой взвешены частицы радиуса R .

1.8 Применение наночастиц металлов и флуоресцентных красителей в исследовании изменения пространственной структуры белка

Процесс взаимодействия БСА с различными флуоресцентными маркерами и наночастицами металлов представляет значительный интерес не только для биофизиков, но и для фармацевтов. Современная медицина широко использует механизмы связывания белка с молекулами различных веществ для синтеза лекарств или для выявления различного рода новообразований в человеческом организме, например, раковых опухолей или меланом.

В работе [6] была проанализирована роль рекомбинантного человеческого коллагена I-го типа в свободной форме или в связи с SNP на фотофизическое и фотохимическое поведение бенгальского розового. Образование агрегатов красителя на поверхности белка наблюдали экспериментально и подтверждали теоретически.

В работе [7] исследуются взаимодействия между пептидом грамицидин А (GramA) и малыми наночастицами серебра, стабилизированными додекантиолом (D-SNP). Для исследования конформации пептида и его

положения внутри фосфолипидного бислоя использовались методы флуоресцентной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния и ИК-спектроскопия.

В работе [8] исследование было направлено на понимание адсорбции бычьего сывороточного альбумина (БСА) на поверхности наночастиц серебра (SNP), получение мягких конъюгатов и твердых конъюгатов функционализированных БСА SNP (SNP-БСА) и их взаимодействия с куркумином.

В работе [9] бычий сывороточный альбумин использовался в качестве стабилизатора и защитного средства для синтеза флуоресцентного комплекса, содержащего наночастицы серебра, (система БСА-SNP) в ледяной бане. Также был предложен метод обнаружения ионов металлов, разработанный с использованием наночастиц серебра в качестве флуоресцентных зондов. Результаты экспериментов показывают, что БСА-SNPs обладают уникальной селективностью по отношению к ионам кобальта и цинка.

В работе [10] рассматриваются взаимодействия между белком БСА и SNP, изучаемые с использованием спектроскопических методов. Показано, что БСА взаимодействует с SNP с образованием стабильного комплекса БСА-SNP. В то же время результаты подразумевают, что взаимодействие SNP с БСА может быть самопроизвольным, в котором основными действующими силами являются водородные связи и гидрофобные взаимодействия.

В работе [11] рассматривается взаимодействие между наночастицами серебра и бычьим сывороточным альбумином при различных значениях pH в водном растворе с помощью флуоресцентной спектроскопии. Отмечается, что анализ спектра флуоресценции и интенсивности флуоресценции показывает, что SNP обладают сильной способностью подавлять собственную флуоресценцию БСА посредством как статических, так и динамических механизмов гашения.

В работе [12] использовали SNP и БСА в качестве инструмента для понимания механизма взаимодействия белков с наночастицами. Данное

исследование на примере анализа результатов спектроскопических методов и анализа размера частиц показало взаимодействие SNP с БСА.

В работе [13] были успешно синтезированы наночастицы серебра с использованием химического восстановления нитрата серебра и охарактеризованы с помощью ЯМР и ИК-Фурье.

В работе [14] исследовался эффект реакции тонких белковых слоев DsRed типа Wilde после адсорбции, взаимодействия и дегидратация белков на твердой поверхности плазмонного субстрата на основе SNP.

В исследовании [15] рассматривается влияние размера коллоидов и их концентрации на усиление флуорофора, расположенного на коллоидных частицах.

В работе [16] используется сверхчувствительный и быстрый флуоресцентный метод. Описанный в данной работе метод позволяет более быстро и качественно проводить обнаружение биомолекул.

В работе [17] демонстрируется антибактериальная активность наночастиц серебра в зависимости от их размер и формы на зеленом флуоресцентном белке (GFP). Измеряя оптические плотность и интенсивность флуоресценции в рекомбинантном GFP, было обнаружено, что SNP в форме пластинок малого размера обладают более высокой антибактериальной активностью, чем более крупные, кубические и сферические SNP.

В работе [18] рассматривается изменение интенсивности видимой флуоресценции наночастиц серебра и железа в разных растворах и при различном покрытии поверхности частиц.

В работе [19] рассматривается новая разработка, являющаяся простой и высокочувствительной системой, в основе которой лежит использование флуоресцентных методов для обнаружения и определения биомаркеров.

В работе [20] сообщается об использовании экстракта зеленого чая и двух входящих в его состав полифенолов для синтеза SNP. Антиоксидантная способность полифенолов зеленого чая показывает значительный потенциал в качестве «мягких» покрывающих/восстанавливающих агентов для синтеза

наночастиц.

В работе [21] представлен ряд растворов для энрофлоксацина, ломефлоксацина и норфлоксацина с разными концентрациями, их интенсивности флуоресценции были определены в идентичных экспериментальных условиях. Результаты показали, что в определенном диапазоне существуют хорошие линейные зависимости между концентрацией для каждого из люминофоров и их интенсивностью флуоресценции в водных растворах.

В диссертации [22] рассматривается взаимодействие различных молекул металлов с флюорофорами разных типов, исследованное методами люминесцентной спектроскопии.

В работе [23] впервые демонстрируется возможность использования флуоресцентных бактерий для исследования антибактериальных свойств наночастиц серебра. Синтез наночастиц производился в среде благоприятной для роста бактерий.

В работе [24] рассматривается изменение размера наночастиц серебра, а также их спектров люминесценции в зависимости от вида и концентрации используемого белка.

В работе [25] дана глубокая оценка взаимодействия SNP разного размера, формы и структуры поверхности с двумя важными плазменными транспортными белками. Одним из наиболее важных результатов этого исследования является наблюдение того, что гликопротеин обладает схожими с БСА свойствами связывания.

В работе [26] рассматривался новый подход для разработки очень быстрого, чувствительного и точного метода определения общего количества белков. Данный метод основан на низких показателях флуоресценции Бенгальского Розового, вызванных процессом связывания красителя с белками. Метод удовлетворительно применялся для определения различных типов белков в растворах сыворотки.

В исследовании [27] демонстрируется, что красные флуоресцентные

белки tdKillerRed, SuperNova и mCherry способны фотосенсибилизировать с O_2 . В этой работе демонстрируется образование 1O_2 и скорости образования O_2 . Результаты данного исследования помогут выяснить механизмы, опосредованные фототоксическими свойствами белков, и помогут в разработке эффективного производства активных форм кислорода при помощи генетически кодируемых фотосенсибилизаторов.

В работе [28] рассматриваются кислородозависимые и кислородно-независимые механизмы в роговице для бенгальского розового фотосенсибилизированного сшивания, чтобы повысить его эффективность для лечения глаз. Результаты данного исследования показали, что краситель фотосенсибилизирует сшивание в роговице за счет механизмов переноса как синглетного кислорода, так и электронов, и что добавление энхансеров может повысить эффективность этого лечения.

В работе [29] показано, что поведение возбужденных молекул бенгальского розового сильно различается в водном растворе и при связывании с сывороточным альбумином человека. Кроме того, данные также показывают, что поведение связанных молекул красителя изменяется в зависимости от среднего количества молекул маркера на белок.

В исследовании [30] исследуются фотофизические свойства бенгальского розового с использованием методов поглощения УФ-видимой области и флуоресцентной спектроскопии при двух различных условиях реакции, а именно в растворах дисперсии нанокompозита полиэтиленimina с оксидом графена и в растворах нанокompозита с высоким содержанием COOH. Нанокompозит имел положительно заряженную поверхность, содержащую функциональную группу $-CONH_2$, которая была модифицирована ковалентными связями. Было обнаружено, что молекулярные взаимодействия красителя в этих средах различны.

В работе [31] были исследованы спектроскопические и фотофизические свойства бенгальской розы, заключенной в бычий сывороточный альбумин, для оценки фотосенсибилизированного образования синглетного

молекулярного кислорода ($^1\text{O}_2$). Результаты показывают, что фотофизические и фотосенсибилизирующие свойства красителя сильно модулируются средним числом молекул красителя на белок.

В исследовании [32] суммируются исследования многих потенциальных применений фотосенсиблизованного сшивания тканевых белков в хирургии и текущие знания о фотохимических механизмах, лежащих в основе образования ковалентных сшивок белок-белок.

В работе [33] представлена схема флуоресцентного мечения белков. Здесь обсуждаются различные типы меток и способы их прикрепления в сочетании с их флуоресцентными свойствами. Выделены преимущества и недостатки этих различных методов, что позволяет проводить тщательный отбор для различных добавок, от анализа ансамблевой спектроскопии до измерений одиночных молекул.

В работе [34] рассматривается зеленый флуоресцентный белок медузы *Aequorea Victoria*, который широко используется в качестве универсальных флуоресцентных меток. Авторы акцентируют внимание на роли флуоресцентных красителей в промышленности и медицине, отдельно рассматривая структуру, эволюцию и функции подобных данному белку, и их многочисленных применениях для визуализации белков, уделяя особое внимание новейшим методам.

В исследовании [35] были протестированы три часто используемых образца: флуоресцеин, сульфат хинин и зеленый флуоресцентный белок; на их пригодность в качестве объекта исследования в зависимости от их срока службы, особенное внимание акцентировалось на их использовании для измерениями двухфотонного возбуждения во временной области.

В работе [36] обсуждаются особенности и проблемы, возникающие при измерениях с различными флуоресцентными соединениями, которые используются в настоящее время.

В работе [37] сравнили пригодность набора коммерческих флуоресцентных красителей для визуализации живых клеток при конъюгации

с Fab-фрагментами.

В работе [38] дается обзор доступных внешних красителей, объясняются их спектральные свойства и показываются наглядные примеры их различных применений в характеристике белков.

В работе [39] описываются процессы, происходящие при связывании красителей различных типов с белком. Исследования проводились при помощи методов флуоресцентной спектроскопии.

В работе [40] рассматривалось предположение, что флуоресцентные красители, часто используемые для маркировки белков в микрососудистых экспериментах, не изменяют физико-химические характеристики белка. Справедливость данной теории была проверена для двух различных белков: бычьего сывороточного альбумина и альфа-лактальбумина.

В работе [41] изучено влияние образования нековалентных межмолекулярных комплексов с бычьим сывороточным альбумином на спектральные и флуоресцентные свойства анионного оксакарбоцианинового красителя.

В исследовании [42] показывается, что конформационные изменения и повышенная молекулярная жесткость красителя из-за его гидрофобного взаимодействия с белком приводят к усилению флуоресценции.

В работе [43] при помощи методов динамического рассеяния света, флуоресценции и УФ-видимой спектроскопии был проведен качественный и количественный мониторинг адсорбции белка БСА на наночастицах серебра.

Работа [44] посвящена роли наночастиц в процессе неправильного свертывания белков. Наночастицы серебра синтезируются с использованием экстракта плодов винограда в качестве восстановителя и оптимизации размера наночастиц путем изменения 2 параметров (рН и объема экстракта винограда).

В работе [45] дается описание кинетики адсорбции и десорбции двух различных флуоресцентных меток на наночастицах серебра с ядром радиусом 3 нм за счет динамического рассеяния света, малоуглового рентгеновского излучения рассеяния и флуоресцентной спектроскопии.

В работе [46] предоставлен исчерпывающий отчет о взаимодействии между куркумин и конъюгатами SNP: БСА. Эксперименты по флуоресценции показали, что силы, ответственные за это взаимодействие, имеют гидрофобную и гидрофильную природу. Исследования подтвердили гидрофильное взаимодействие между куркумин и соседними остатками. Исследования методом инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием по усилению флуоресценции подтвердили небольшую разницу в константе ассоциации между твердыми и мягкими конъюгатами.

В работе [47] исследуется взаимодействие модельного белка, бычьего сывороточного альбумина, с наночастицами серебра с использованием спектров флуоресценции, синхронной флуоресценции, поглощения ультрафиолетового излучения, методов инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием и кругового дихроизма в водных растворах.

В работе [48] представлены свидетельства новых аспектов, касающихся связывания БСА с лигандом, в данном случае натриевой солью флуоресцеина. Эти результаты являются новыми в области исследования связывания БСА и показывают, что эти эксперименты с участием белка должны проводиться очень осторожно, так как должно быть учтено большое количество аспектов.

В работе [49] было проведено исследование с помощью методов флуоресцентной спектроскопии для определения общих флуоресцентных свойств свободных флуоресцеиновых красителей до и после связывания с молекулами белка.

ГЛАВА 2 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина для изучения его флуоресцентных характеристик в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра.

Были подготовлены следующие буферные составы: 1) 0,1 М CH_3COOH – KOH (pH 3,5-5,0); 2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (pH 6,0-8,0).

Для изучения флуоресцентных характеристик бычьего сывороточного альбумина были приготовлены следующие растворы с различными значениями pH (3,5 – 8,0):

- 1) растворы бычьего сывороточного альбумина (500 мкМ);
- 2) раствор бенгальского розового (3 мкМ; 6 мкМ);
- 3) раствор наночастиц серебра (50 мкМ).

В последствии при смешивании исходных растворов с буфером получились следующие системы:

- 1) система «белок + буфер» при трех концентрациях белка (225 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и при шести значениях pH буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 и 8,0 pH);
- 2) система «наночастицы серебра + белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и трех концентрациях серебра ($0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$, $0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ и $0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) и при шести значениях pH буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 и 8,0 pH);
- 3) система «краситель + белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и двух концентрациях бенгальского розового (3 мкМ и 6 мкМ) и при шести значениях pH буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 pH);
- 4) система «краситель+ наночастицы серебра + белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ), двух

концентрациях бенгальского розового (3 мкМ и 6 мкМ) и трех концентрациях серебра ($0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$, $0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ и $0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) и при шести значениях рН буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 рН).

2.2 Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина для изучения изменения его диаметра в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра.

Были подготовлены следующие буферные составы: 1) 0,1 М CH_3COOH – KOH (рН 3,5-5,0); 2) 0,1 М KH_2PO_4 – 0,1 М NaOH (рН 6,0-8,0).

Для изучения гидродинамического радиуса бычьего сывороточного альбумина были приготовлены следующие растворы с различными значениями рН (3,5 – 8,0):

- 1) растворы бычьего сывороточного альбумина (500 мкМ);
- 2) раствор бенгальского розового (3 мкМ и 6 мкМ);
- 3) раствор наночастиц серебра (50 мкМ).

В последствии при смешивании исходных растворов с буфером получились следующие системы:

- 1) система «белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и при шести значениях рН буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0;7,0 и 8,0 рН);
- 2) система «наночастицы серебра + белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и трех концентрациях серебра ($0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$, $0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ и $0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) и при шести значениях рН буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 рН);
- 3) система «краситель + белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и двух концентрациях бенгальского розового (3 мкМ и 6 мкМ) и при шести значениях рН буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 рН);

4) система «краситель+ наночастицы серебра + белок + буфер» при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ), двух концентрациях бенгальского розового (3 мкМ и 6 мкМ) и трех концентрациях серебра ($0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$, $0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ и $0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) и при шести значениях pH буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 pH).

2.3 Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения флуоресцентных характеристик и констант тушения флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра

Исследования флуоресцентных характеристик бычьего сывороточного альбумина, как в растворах с бенгальским розовым и наночастицами серебра, так и в растворах без примесей проведены с помощью спектрофлуориметра SOLAR PB 2203 при комнатной температуре.

Флуоресценция бычьего сывороточного альбумина возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$. Область сканирования 305 – 500 нм. Полученные спектры обработаны программой OriginPro 8.5 и Microsoft Excel.

Синхронные спектры люминесценции снимались на области 250-500 нм при двух различных сдвигах волны $\Delta\lambda$ 15 нм и 60 нм. Полученные спектры обработаны программой OriginPro 8.5 и Microsoft Excel.

Параллельно и перпендикулярно поляризованная флуоресценция бычьего сывороточного альбумина возбуждалась светом с длиной волны $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$. Область сканирования 250 – 500 нм. Полученные спектры обработаны программой OriginPro 8.5 и Microsoft Excel.

2.4 Методика экспериментов на спектрофотометре для изучения спектров поглощения бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра

Исследования спектров поглощения бычьего сывороточного альбумина, как в растворах с бенгальским розовым и наночастицами

серебра, так и в растворах без примесей проведены с помощью спектрофотометра SOLAR PB 2201 при комнатной температуре. Область сканирования 250-500 нм. Полученные спектры обработаны программой OriginPro 8.5 и Microsoft Excel.

2.5 Методика экспериментов на корреляционном спектрографе для изучения динамики изменения размеров бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра

Размеры систем, образующихся при взаимодействии бычьего сывороточного альбумина при различных показателях pH среды с молекулами бенгальского розового и наночастицами серебра, определялись методом корреляционной спектроскопии рассеянного света на корреляционном спектрометре PhotocorCompact с термостабилизированным диодным лазером с длиной волны 650 нм при комнатной температуре. Полученные корреляционные функции рассеянного света обработаны программой DynaLS.

ГЛАВА 3ц

3.1 Спектры люминесценции

В ходе данной работы были исследованы спектрально – флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина при различных рН, а также при добавлении наночастиц серебра и флуоресцентного красителя – бенгальского розового. В качестве примеров приведены спектры люминесценции БСА при изменении рН раствора (рис 3.1), при изменении концентрации наночастиц серебра (рис. 3.2 (а)) и при изменении концентрации БР (рис.3.2 (б)).

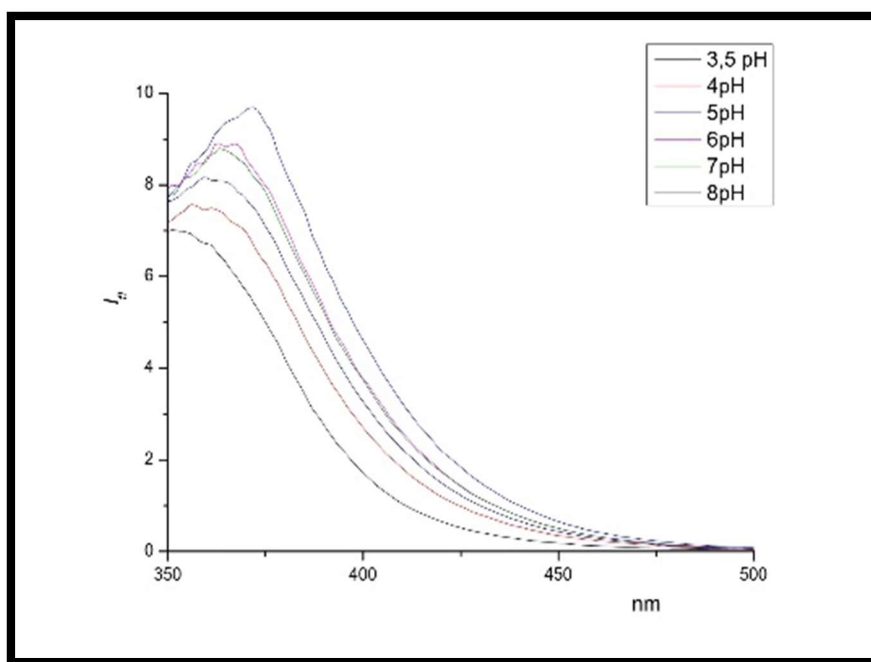


Рис.3.1 Спектры люминесценции БСА (50 мкМ) при различных рН

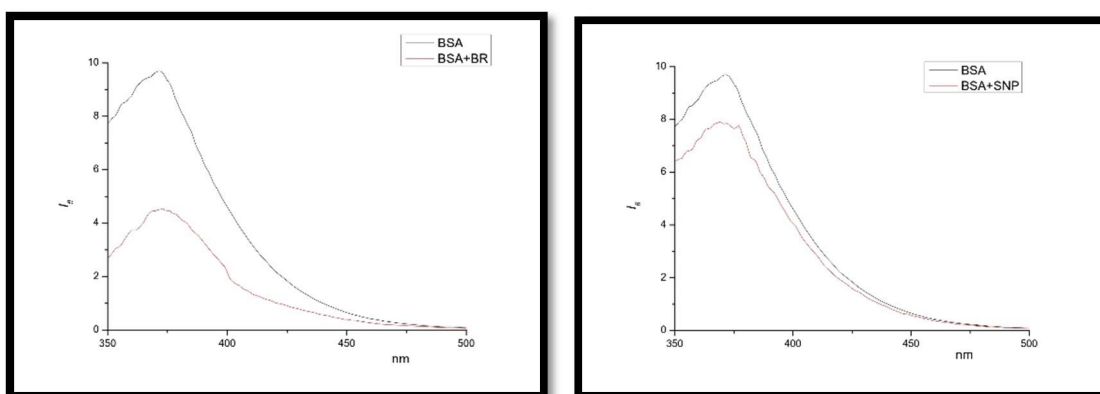


Рис. 3.2 Спектры люминесценции БСА (50 мкМ) без примесей и с бенгальским розовым ($30 \cdot 10^{-10} M$) при рН равном 5(а), спектры люминесценции БСА (50 мкМ) без примесей и с наночастицами серебра ($0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) при рН равном 5(б)

В ходе исследования спектров люминесценции БСА было отмечено, что при изменении pH происходит смещение пиков люминесценции. Так, например, при одинаковых концентрациях БСА равной 25 мкМ в буфере при pH равном 3,5 максимум люминесценции достигается на 331 нм, в то время как при pH равном 5,0 - на 364 нм (рис.3.3). Аналогичная ситуация отмечается и при изменении концентрации БР и наночастиц серебра в растворах. Однако, стоит отметить, что зависимость смещения пика люминесценции имеет нелинейный вид с максимумом при pH равном 5,0. В процессе работы были составлены таблицы смещений пика люминесценции в зависимости от концентрации БСА, БР, наночастиц серебра и pH раствора (Табл.1, 2, 4, 6).

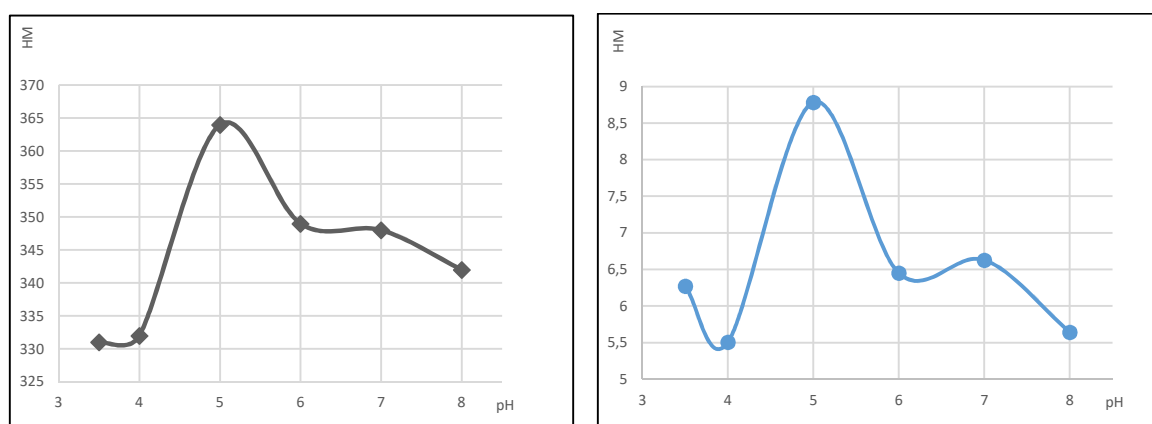


Рис. 3.3 График зависимости смещения пика(а)и значения пика(б) люминесценции БСА в зависимости от pH среды.

		$0,2 \cdot 10^{-9}$ molL^{-1} SNP \\ 3мкМ БР	$0,2 \cdot 10^{-9}$ molL^{-1} SNP \\ 6 мкМ БР	$0,4 \cdot 10^{-9}$ molL^{-1} SNP \\ 3 мкМ БР	$0,4 \cdot 10^{-9}$ molL^{-1} SNP \\ 6 мкМ БР	$0,6 \cdot 10^{-9}$ molL^{-1} SNP \\ 3 мкМ БР	$0,6 \cdot 10^{-9}$ molL^{-1} SNP \\ 6 мкМ БР
pH3,5	25 мкМ БСА	332	336	331	328	330	325
pH3,5	50 мкМ БСА	330	333	329	330	329	327
pH3,5	75 мкМ БСА	329	333	325	328	328	330
pH4,0	25 мкМ БСА	344	351	330	330	327	324
pH4,0	50 мкМ БСА	353	349	335	328	327	328
pH4,0	75 мкМ БСА	356	349	329	329	329	331
pH5,0	25 мкМ БСА	345	330	327	331	330	331
pH5,0	50 мкМ БСА	360	347	331	325	329	327
pH5,0	75 мкМ БСА	354	357	331	327	331	331
pH6,0	25 мкМ БСА	340	336	330	329	330	326
pH6,0	50 мкМ БСА	355	355	336	335	329	331
pH6,0	75 мкМ БСА	362	353	327	332	332	334
pH7,0	25 мкМ БСА	335	340	329	329	326	330
pH7,0	50 мкМ БСА	359	363	330	345	329	326
pH7,0	75 мкМ БСА	359	367	331	334	330	329

pH8,0	25 мкМ БСА	357	353	325	330	336	326
pH8,0	50 мкМ БСА	365	359	325	330	329	329
pH8,0	75 мкМ БСА	366	355	328	331	332	321

Табл.1 Смещение пиков люминесценции БСА при изменении pH (3,5-8,0), концентрации БСА(25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ, наночастиц серебра ($50 \cdot 10^{-9}$ М, $100 \cdot 10^{-9}$ М и $150 \cdot 10^{-9}$ М) и БР(3 мкМ и 6 мкМ).

		БР 3 мкМ	БР 6 мкМ
3,5 pH	25 мкМ БСА	345	330
3,5 pH	50 мкМ БСА	346	330
3,5 pH	75 мкМ БСА	365	329
4,0 pH	25 мкМ БСА	336	330
4,0 pH	50 мкМ БСА	339	342
4,0 pH	75 мкМ БСА	362	332
5,0 pH	25 мкМ БСА	330	323
5,0 pH	50 мкМ БСА	373	372
5,0 pH	75 мкМ БСА	375	375
6,0 pH	25 мкМ БСА	329	328
6,0 pH	50 мкМ БСА	339	341
6,0 pH	75 мкМ БСА	354	341
7,0 pH	25 мкМ БСА	329	327
7,0 pH	50 мкМ БСА	328	332
7,0 pH	75 мкМ БСА	326	332
8,0 pH	25 мкМ БСА	331	328
8,0 pH	50 мкМ БСА	331	345
8,0 pH	75 мкМ БСА	351	353

Табл.2 Смещение пиков люминесценции БСА при изменении pH (3,5-8,0), концентрации БСА(25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и БР(3 мкМ и 6 мкМ).

		$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1} \text{ SNP}$	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1} \text{ SNP}$	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1} \text{ SNP}$
3,5 pH	25 мкМ БСА	331	326	327
3,5 pH	50 мкМ БСА	328	354	360
3,5 pH	75 мкМ БСА	361	364	365
4,0 pH	25 мкМ БСА	327	334	351
4,0 pH	50 мкМ БСА	359	332	368
4,0 pH	75 мкМ БСА	369	359	372
5,0 pH	25 мкМ БСА	362	364	358
5,0 pH	50 мкМ БСА	367	369	367
5,0 pH	75 мкМ БСА	371	372	376
6,0 pH	25 мкМ БСА	361	353	357
6,0 pH	50 мкМ БСА	373	370	364
6,0 pH	75 мкМ БСА	372	371	369
7,0 pH	25 мкМ БСА	337	356	355
7,0 pH	50 мкМ БСА	368	364	371
7,0 pH	75 мкМ БСА	368	369	367
8,0 pH	25 мкМ БСА	346	347	332
8,0 pH	50 мкМ БСА	368	365	367

8,0 pH	75 мкМ БСА	370	365	367
--------	------------	-----	-----	-----

Табл.3 Смещение пиков люминесценции БСА при изменении pH (3,5-8,0), концентрации БСА(25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и наночастиц серебра (50 нМ, 100 нМ и 150 нМ).

	pH3,5	pH4,0	pH5,0	pH6,0	pH7,0	pH8,0
25 мкМ БСА	331	332	364	349	348	342
50 мкМ БСА	324	356	372	363	363	359
75 мкМ БСА	362	363	371	370	368	365

Табл.4 Смещение пиков люминесценции БСА при изменении pH (3,5-8,0) и концентрации БСА(25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ).

В данной работе также были рассчитаны при помощи метода Штерна-Фольмера коэффициенты тушения люминесценции в зависимости от концентрации, которые представлены в таблице 5. Так было выяснено, что коэффициенты тушения достигают своего максимума при тушении наночастицами серебра при pH 5,0, при использовании в качестве тушителя БР максимум коэффициента тушения достигается при pH 6,0 (рис. 3.4).

		$0,2 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP	$0,4 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP	$0,6 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP	3 мкМ BR	6 мкМ BR	$0,2 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP \\ 3 мкМ БР	$0,2 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP \\ 6 мкМ БР	$0,4 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP \\ 3 мкМ БР	$0,4 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP \\ 6 мкМ БР	$0,6 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP \\ 3 мкМ БР	$0,6 \cdot 10^{-9}$ molL ⁻¹ SNP \\ 6 мкМ БР
3,5 pH	25 мкМ БСА	0,068276	0,031743	0,060329	0,10649	4,308093	0,498148	1,316808	0,346096	1,860915	1,123848	1,51071
3,5 pH	50 мкМ БСА	0,088898	0,099706	0,038192	0,057276	3,133946	0,292972	0,56132	0,138297	0,641692	0,110492	1,299155
3,5 pH	75 мкМ БСА	0,06733	0,066893	0,113583	1,441429	2,075765	0,204673	0,563344	0,175986	0,726384	-0,04859	0,940853
4,0 pH	25 мкМ БСА	0,034932	0,127339	0,080969	1,931954	11,23496	3,168549	5,342694	0,474077	2,711668	2,615885	8,130635
4,0 pH	50 мкМ БСА	0,078408	0,576408	0,083614	1,31386	3,193991	0,938659	1,935505	0,953279	1,85766	1,37583	5,662771
4,0 pH	75 мкМ БСА	0,060968	0,289379	0,077054	0,921452	1,913534	0,572135	1,307673	0,127073	1,095209	0,525924	2,911741
5,0 pH	25 мкМ БСА	0,469621	0,300931	0,504965	7,564902	4,706977	6,549085	20,38605	4,368172	16,04977	7,884546	44,66477
5,0 pH	50 мкМ БСА	0,259703	0,224331	0,263005	1,129099	3,117609	1,313412	4,175786	1,237955	7,567764	1,816853	18,65849
5,0 pH	75 мкМ БСА	0,18707	0,151501	0,16278	0,678748	1,560244	0,614598	1,749676	0,273559	2,8433	0,5858	7,056644
6,0 pH	25 мкМ БСА	0,026029	0,088105	0,133518	8,900956	19,52765	6,361374	20,59465	6,125957	9,712411	9,449175	18,74315
6,0 pH	50 мкМ БСА	0,083121	0,135808	0,182612	1,830723	7,50833	1,42873	6,645708	1,877659	5,264558	2,743192	15,23206
6,0 pH	75 мкМ БСА	0,168175	0,14111	0,206424	0,880737	3,410697	0,695862	2,169122	0,6415	3,049264	1,299248	7,809553
7,0 pH	25 мкМ БСА	0,266028	0,199718	0,131479	2,258132	10,98069	5,921276	19,63806	8,932721	25,51344	10,71895	42,20712
7,0 pH	50 мкМ БСА	0,234356	0,247224	0,150749	1,028944	4,794568	1,299632	5,571037	4,662028	21,93076	2,629622	15,41281
7,0 pH	75 мкМ БСА	0,19433	0,193298	0,234957	0,758127	2,486987	0,682246	1,868728	1,310785	9,891171	1,360974	5,249582
8,0 pH	25 мкМ БСА	0,06464	0,026346	0,072107	3,411658	14,69635	2,935146	6,272892	6,403976	25,49156	13,16961	26,03374
8,0 pH	50 мкМ БСА	0,156403	0,140648	0,151658	1,122364	5,600748	1,277035	3,774963	1,647161	11,54337	2,862205	12,41299
8,0 pH	75 мкМ БСА	0,177426	0,17362	0,232926	0,621743	2,082212	0,551893	2,328891	0,736636	6,597002	1,294194	7,656178

Табл.5 Таблица зависимости коэффициента тушения от pH при различных концентрациях БСА и его тушителей при разных значениях pH

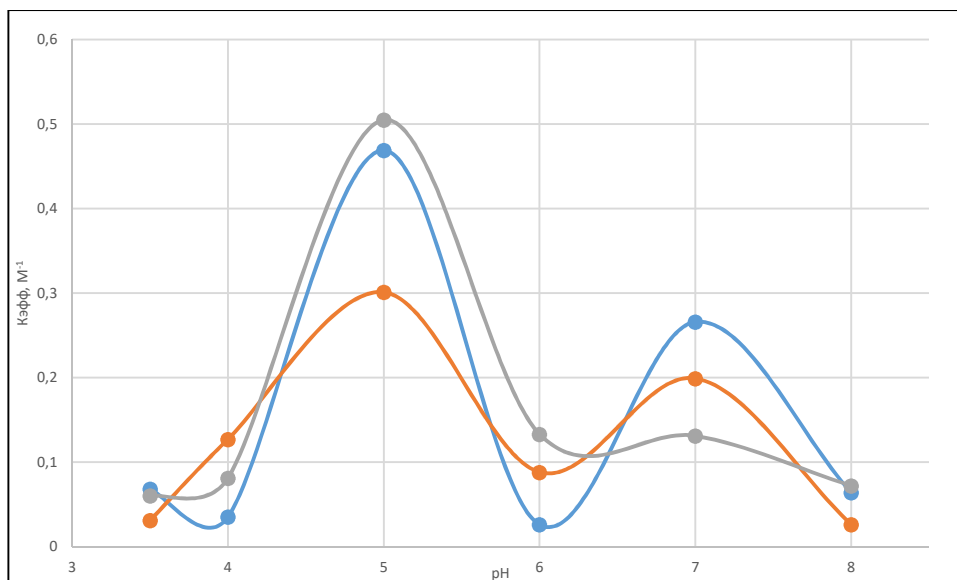


Рис.3.4 График зависимости коэффициента тушения БСА (50 мкМ) от pH, при различных концентрациях наночастиц серебра.

3.2 Спектры поляризованной люминесценции

В данной работе также изучались спектры поляризованной люминесценции БСА с различными тушителями. В качестве примеров представлены графики спектров поляризованной люминесценции БСА без тушителей (Рис. 3.5(а)), БСА с БР (Рис. 3.5(б)), БСА и наночастицами серебра (Рис. 3.6(а)) и БСА с наночастицами серебра и БР (Рис.3.6(б)).

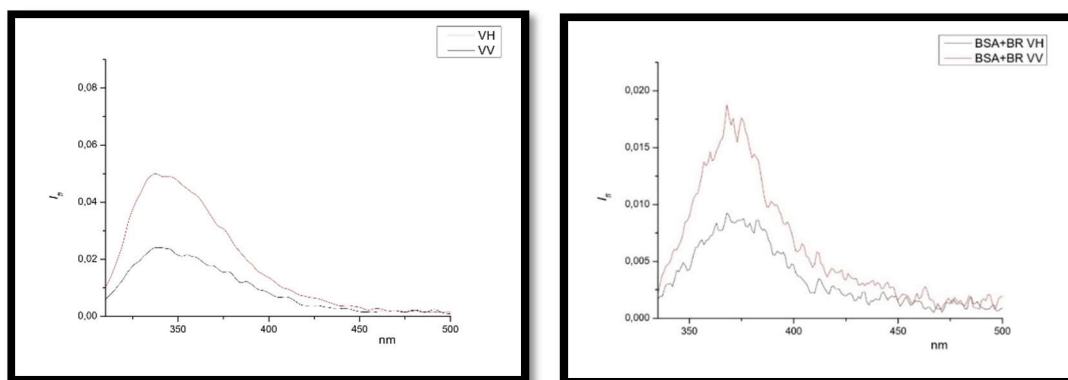


Рис. 3.5 Спектры поляризованной люминесценции БСА (50 мкМ) без примесей при pH равном 5(а), спектры поляризованной люминесценции БСА (50 мкМ) с бенгальским розовым (3 мкМ) при pH равном 5,0(б)

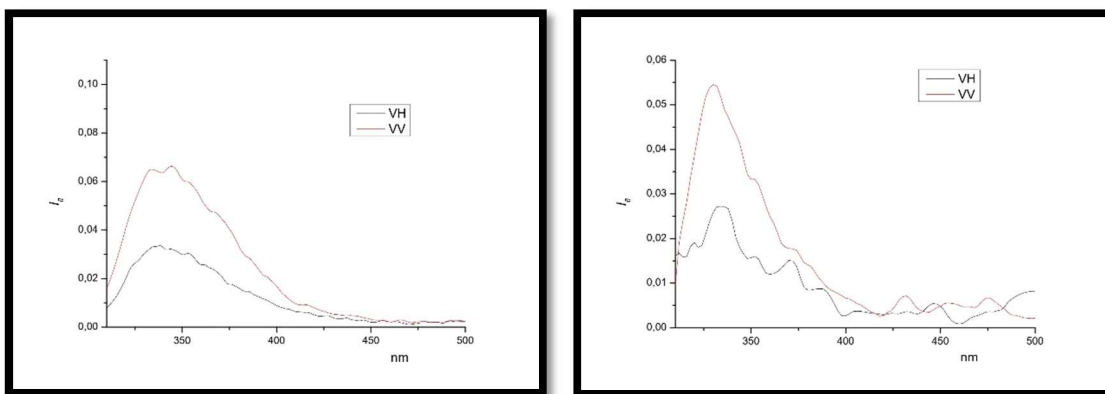


Рис.3.6 Спектры поляризованной люминесценции БСА (50 мкМ) с наночастицами серебра ($0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) при рН равном 5,0 (а), спектры поляризованной люминесценции БСА (50 мкМ) с наночастицами серебра ($0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) и бенгальским розовым (3 мкМ) при рН равном 5,0 (б)

В данной работе также были рассчитаны степени поляризации и анизотропии БСА, в качестве примера приведен графики зависимости степени поляризации и анизотропии от рН раствора при добавлении в раствор БСА наночастиц серебра или БР (Рис 3.7). Было отмечено, что при добавлении наночастиц серебра в раствор степени поляризации и анизотропии изменяются незначительно.

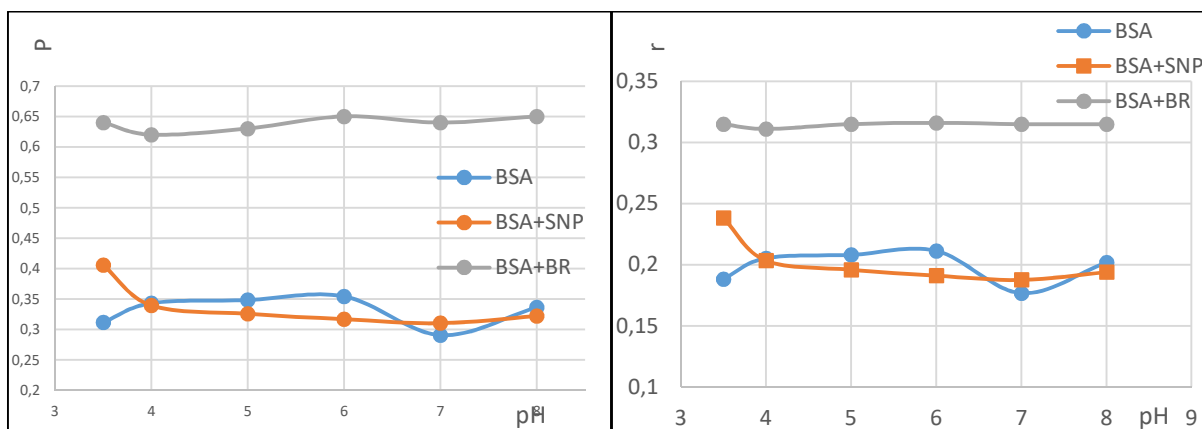


Рис. 3.7 График зависимости степени поляризации(а)и анизотропии(б) БСА(50 мкМ) в зависимости от рН среды с наночастицами серебра ($150 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$) и БР(3 мкМ)

3.3 Спектры поглощения

В данном параграфе приведено рассмотрение спектров поглощения БСА как с наночастицами серебра, так и без них. Для примера приведен спектр (Рис.3.8) поглощения БСА (БСА 75 мкМ) без наночастиц серебра и с наночастицами (SNP $150 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$), на котором видно, что поглощение раствора с серебром выше, чем у раствора без серебра.

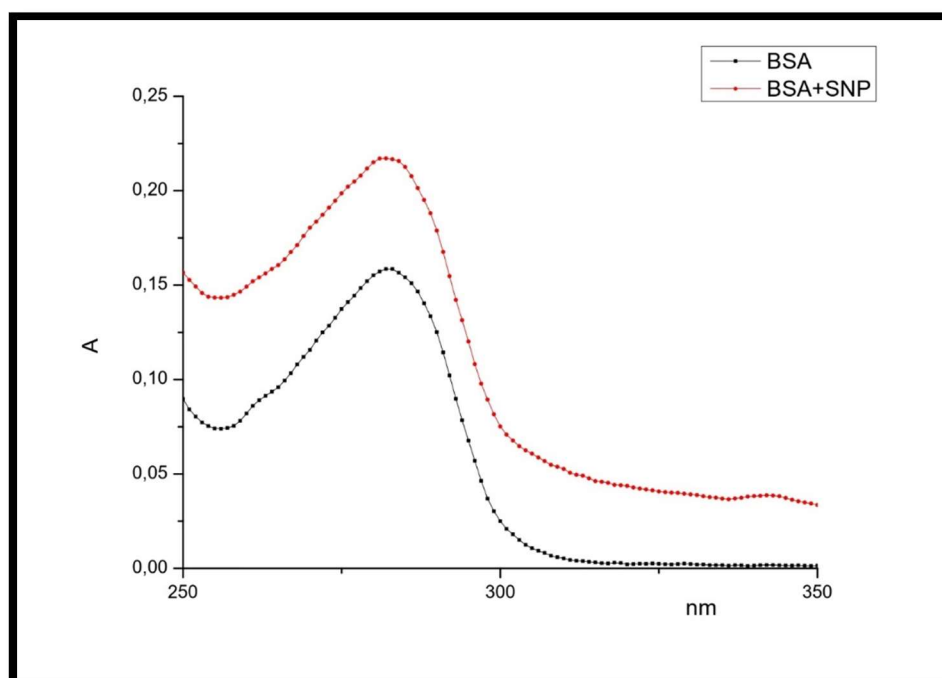


Рис. 3.8 Спектры поглощения БСА с наночастицами серебра и без них.

Также с помощью метода Бенези – Хильдебранда, были рассчитаны константы ассоциации K_{app} наночастиц серебра с БСА, при разных концентрациях белка в различных рН(Табл.6).

рН	Концентрация БСА	$K_{app}, 10^9 M^{-1}$
3,5 рН	25 мкМ БСА	0,627523
3,5 рН	50 мкМ БСА	0,469458
3,5 рН	75 мкМ БСА	1,173732
4,0 рН	25 мкМ БСА	0,242091
4,0 рН	50 мкМ БСА	0,427152
4,0 рН	75 мкМ БСА	0,952784
5,0 рН	25 мкМ БСА	0,255355
5,0 рН	50 мкМ БСА	0,091896
5,0 рН	75 мкМ БСА	0,019707
6,0 рН	25 мкМ БСА	1,091193
6,0 рН	50 мкМ БСА	2,913812
6,0 рН	75 мкМ БСА	1,899551
7,0 рН	25 мкМ БСА	0,315701
7,0 рН	50 мкМ БСА	0,419366
7,0 рН	75 мкМ БСА	0,45964
8,0 рН	25 мкМ БСА	0,130505
8,0 рН	50 мкМ БСА	0,186847
8,0 рН	75 мкМ БСА	0,164859

Табл.6 Таблица зависимости K_{app} от концентрации БСА и рН системы

3.4 Размеры частиц

В данном параграфе рассматривается изучение изменения диаметра наночастиц серебра в зависимости от рН среды и концентрации БСА и БР в растворе наночастиц серебра. При помощи методов корреляционной спектроскопии было выяснено, что рН среды незначительно влияет на диаметр образующихся структур серебра без примесей БСА и БР. Наночастицы серебра образуют структуры размером 70-120 Å (Табл. 7). При взаимодействии наночастиц серебра с БСА (Табл. 8) образующиеся комплексы достигают своего максимального значения порядка 160 Å при рН равном 5,0, что связано с изменением пространственной структуры белка, которая достигает своих максимальных размеров порядка 48 Å при рН 5,0. В системах, в которых взаимодействовали наночастицы серебра, БСА и БР (Табл. 9), замечено увеличение размера образующихся лигандов на 10-20 Å, что говорит о том, что БР также участвует в связывании с БСА и наночастицами серебра.

рН	SNP	Диаметр без примесей, Å
3,5 рН	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	93,5
3,5 рН	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	121,64
3,5 рН	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	127,3
4,0 рН	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	95,37
4,0 рН	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	126,0728
4,0 рН	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	129,846
5,0 рН	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	114,7
5,0 рН	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	120,6
5,0 рН	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	135,5
6,0 рН	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	71,79
6,0 рН	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	77,3
6,0 рН	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	115,9
7,0 рН	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	64,3
7,0 рН	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	57,05
7,0 рН	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	67,86
8,0 рН	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	68,86
8,0 рН	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	95,3
8,0 рН	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	110,6

Табл.7 Таблица зависимости размеров наночастиц серебра от их концентраций при различных рН среды.

pH	SNP	25 мкМ БСА	50 мкМ БСА	75 мкМ БСА
3,5 pH	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	92,41	113,7	179
3,5 pH	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	63,93	91,76	35,13
3,5 pH	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	131,5	100,4	97,35
4,0 pH	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	212,2	188,2	109,3
4,0 pH	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	158,1	101,32	375,7
4,0 pH	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	185,6	71,14	196,6
5,0 pH	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	161,77	156,79	82,84
5,0 pH	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	121,2	180	192,1
5,0 pH	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	154,18	160,76	80,44
6,0 pH	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	117,7	83,37	70,48
6,0 pH	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	103,9	65,68	84,13
6,0 pH	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	165,6	240	236
7,0 pH	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	111,2	78,64	78,63
7,0 pH	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	113,6	72,82	72,78
7,0 pH	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	120,2	68,34	68,35
8,0 pH	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	123,8	112,1	112,1
8,0 pH	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	58,93	212,2	212,4
8,0 pH	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP	167,8	64,08	64,05

Табл.8 Таблица зависимости размеров наночастиц серебра от их концентраций и концентрации БСА при различных pH среды.

pH	SNP, $\cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP/	$0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP/	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP/	$0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP/	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP/	$0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ SNP/
		3 мкМ БП	6 мкМ БП	3 мкМ БП	6 мкМ БП	3 мкМ БП	6 мкМ БП
3,5 pH	0,2	95,49	75,55	173,5	106,94	83,86	192,58
3,5 pH	0,4	112,4	80,63	93,77	125,88	89,49	104,08
3,5 pH	0,6	94,5	60,07	83,07	105,84	66,67	92,2
4,0 pH	0,2	62,93	99,64	105,7	70,48	110,6	117,32
4,0 pH	0,4	87,44	110	82,25	97,93	122,1	91,29
4,0 pH	0,6	129,3	100,9	94,95	144,81	111,99	105,39
5,0 pH	0,2	96,07	154,8	164	107,59	171,82	182,04
5,0 pH	0,4	102,14	154,03	178,61	114,39	170,97	198,25
5,0 pH	0,6	100,56	160,31	170,63	112,62	177,94	189,39
6,0 pH	0,2	100,4	135,9	140,7	112,44	150,84	156,1
6,0 pH	0,4	68,65	101,6	133,7	76,88	112,77	148,4
6,0 pH	0,6	100,5	99,28	105,1	112,56	110,2	116,661
7,0 pH	0,2	151	166,5	243,3	169,12	184,81	270,06
7,0 pH	0,4	74,69	63,46	61,53	83,65	70,44	68,29
7,0 pH	0,6	68,95	61,41	51,85	77,22	68,16	57,55
8,0 pH	0,2	59,03	54,21	40,09	66,11	60,17	44,49
8,0 pH	0,4	205,4	282,3	361	230,04	313,35	400,71
8,0 pH	0,6	201,3	142,2	174	225,45	157,84	193,14

Табл.9 Таблица зависимости размеров наночастиц серебра от их концентраций и при изменении концентрации БСА и БП при различных pH среды.

3.5 Синхронные спектры люминесценции

В данном параграфе приводится анализ синхронных спектров люминесценции при сдвиге между волнами флуоресценции и возбуждения флуоресценции 15 и 60 нм. Сдвиг волн выбран таким образом, чтобы по получившимся спектрам можно было получить информацию об остатках Тирозина и Триптофана в БСА. В качестве примеров представлены синхронные спектры с БСА без примесей (рис. 3.8(а) и рис. 3.8(б)), с БСА с наночастицами серебра (рис. 3.9(а)) и с БСА и БР (рис. 3.9(б)).

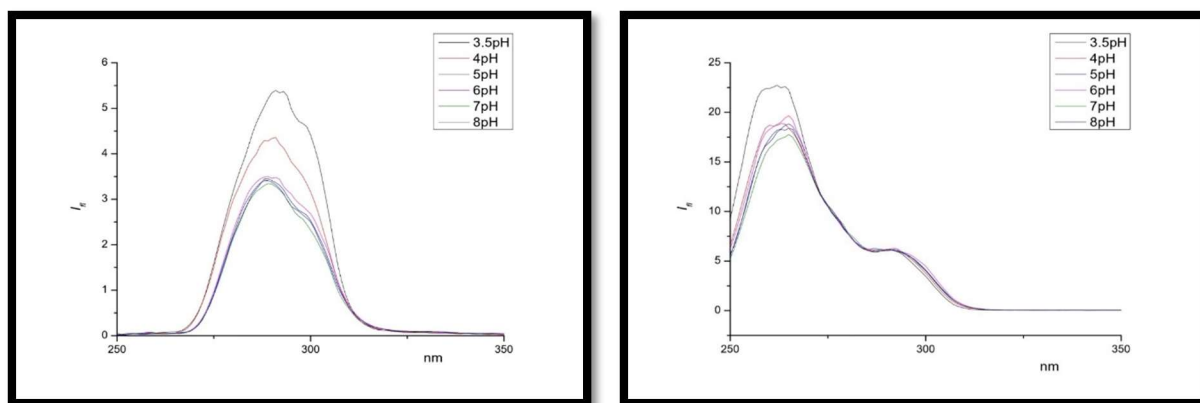


Рис. 3.8 Синхронные спектры люминесценции БСА (50 мкМ) при различных рН и $\Delta\lambda=15$ нм(а) $\Delta\lambda=60$ нм(б)

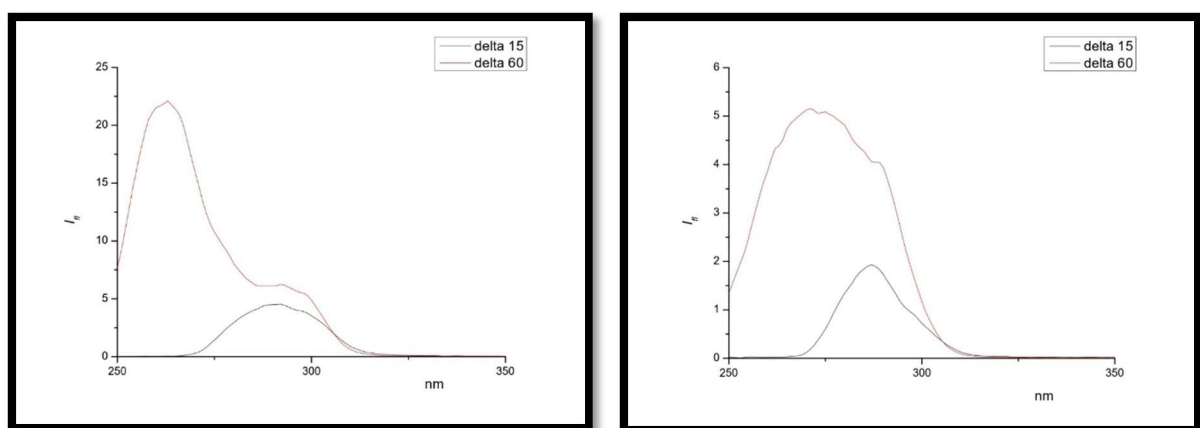


Рис. 3.9 Синхронные спектры люминесценции БСА (50 мкМ) наночастицами серебра ($0,4 \cdot 10^{-9}$ molL⁻¹) (а) с бенгальским розовым (3 мкМ) (б) при рН равным 6,0

В системе «БСА + наночастица серебра» при сдвиге волн в 15 нм наблюдается смещение пика люминесценции в синюю область (рис. 3.10(а)), что говорит о том, что в процессе взаимодействия наночастиц серебра и БСА, участвуют остатки Тирозина в третичной структуре белка. При $\Delta\lambda=60$ нм (рис. 3.10(б)) смещения не наблюдается, что говорит о том, что Триптофан не участвует в формировании домена «БСА + наночастица серебра».

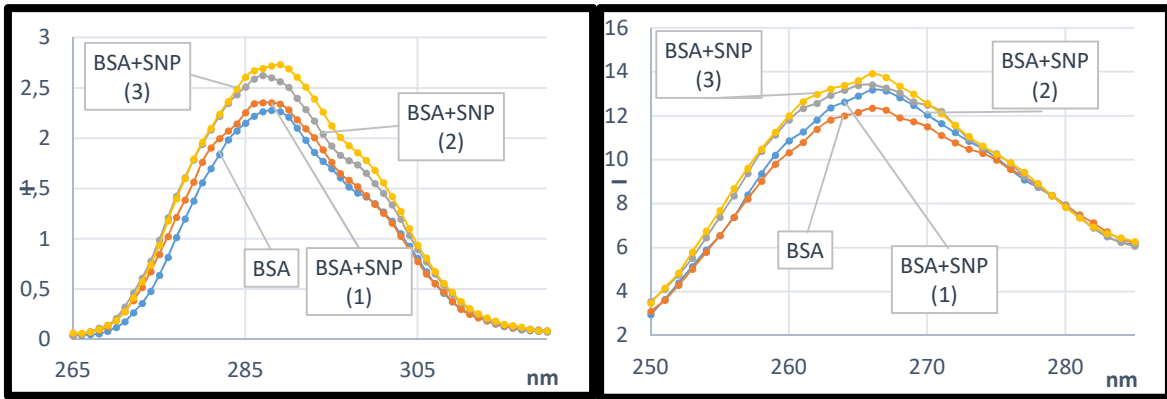


Рис. 3.10 Синхронные спектры люминесценции БСА (25 мкМ) без примесей и с наночастицами серебра различных концентраций ($0,2 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ (1), $0,4 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ (2) и $0,6 \cdot 10^{-9} \text{ molL}^{-1}$ (3)) при рН равным 7,0 при $\Delta\lambda=15 \text{ нм}$ (а) и $\Delta\lambda=60 \text{ нм}$ (б).

При взаимодействии БР и БСА видна диаметрально противоположная картина: при $\Delta\lambda=15 \text{ нм}$ (3.11(а)), смещение отсутствует, в то время, как при $\Delta\lambda=60 \text{ нм}$ (3.11(б)) наблюдается смещение в красную область, что, в свою очередь, говорит о том, что основную роль при взаимодействии БР и БСА играет Триптофан.

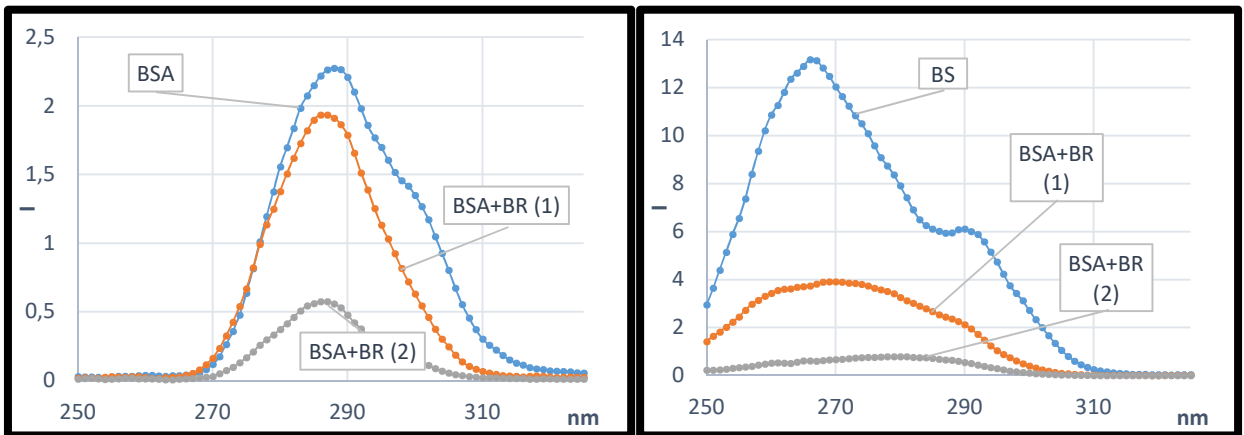


Рис. 3.11 Синхронные спектры люминесценции БСА (25 мкМ) без примесей и с БР различных концентраций (3 мкМ (1) и 6 мкМ (2)) при рН равным 7,0 при $\Delta\lambda=15 \text{ нм}$ (а), $\Delta\lambda=60 \text{ нм}$ (б)

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методом флуоресцентной спектроскопии был проведен анализ растворов БСА с наночастицами серебра, с молекулами красителя и растворов белка без SNP и БР при различных значениях рН (от 3,5 до 8,0). Наблюдалось смещение пика люминесценции при варьировании кислотности среды (при изменении рН).
2. Были рассчитаны коэффициенты тушения люминесценции при добавлении в раствор наночастиц серебра или молекул флуоресцентного красителя и рассмотрены изменение этой величины в зависимости от рН и заряда белка.
3. Методом поляризованной флуоресценции были рассчитаны степень поляризации и анизотропии и показано, что при добавлении в раствор белка наночастиц серебра или БР значения параметров P и r изменяются незначительно.
4. Для анализа связывания комплекса белок+ наночастица (красителя или серебра) были рассчитаны как размеры каждого исследуемого объекта в отдельности (БСА, SNP, БР), так и целой системы.
5. Было показано, что зависимости максимума спектра флуоресценции БСА λ_{\max} и ее интенсивности в максимуме спектра I_{\max} от рН раствора имеют S-образный вид. Такое изменение данных величин предполагает изменение локального микроокружения, полярности, структурной конформации и внутреннего переноса заряда вокруг поверхности остатка триптофана.
6. Полученные ССФ для растворов белка и SNP позволили наблюдать уменьшение отношения T_{gr} и T_{ug} при исследуемых рН.
7. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что при добавление в растворы БСА наночастиц серебра наблюдается тушение флуоресценции БСА, которое происходит из-за связывания между БСА и частицами серебра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. // 1994, Издательство московского университета.
2. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Люминесценция и её измерения. // 1989, Издательство московского университета.
3. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии // 1986, Москва, Мир
4. Кулешова А.А. Диссертация «Флуоресцентные характеристики наномаркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточных альбуминов» // С.1-30
5. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0// *Bioinformatics*. – 2007. – Т.23(21). – С. 2947 – 2948.
6. J. Simpson, Impact of Dye-Protein Interaction and Silver Nanoparticles on Rose Bengal Photophysical Behavior and Protein Photocrosslinking // McMaster University, National Library Of Medicine, 2013
7. Marta Gambucci, A multi-spectroscopic approach to investigate the interactions between Gramicidin A and silver nanoparticles // *Soft Matter*, 2019, n.15
8. Vinod D., Jaiswal and P.M. Dongre, Biophysical interactions between silver nanoparticle-albumin interface and curcumin // *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, p. 164-177
9. Ning Wang, Lu Ga2 and Jun Ai, Synthesis of fluorescent BCA templated silver nanomaterials and it's application of detection of Zn²⁺ and Co²⁺ // *Materials Research Express*, 2018, v. 5, n. 10
10. Gongke Wang, Yanfang Lu, Huimin Hou and Yufang Liu, Probing the binding behavior and kinetics of silver nanoparticles with bovine serum albumin // *RSC Advances*, 2017, n. 7(15)
11. Jessy Mariam, P. M. Dongre, D. C. Kothari, Study of Interaction of Silver

- Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy
// *Journal of Fluorescence*, 2011, v. 21
12. Nandita Dasgupta, Shivendu Ranjan, Dhableswar Patra, Priyanka Srivastava, Ashutosh Kumar, Chidambaram Ramalingam, Bovine serum albumin interacts with silver nanoparticles with a “side on” or “end on” conformation // *Chemico-biological Interactions*, 2016, n.253, p. 100
 13. Ajeet Singh, Shaline Jha, Garima Srivastava, Preeti Sarkar, Prerana Gogoi, Silver Nanoparticles As Fluorescent Probes: New Approach For Bioimaging // *International journal of scientific & technology research*, 2013, v. 2, i. 11
 14. Adriana Scarangella, Marvine Soumbo, Adnen Mlayah, Caroline Bonafos, Marie-Carmen Monje, Christine Roques, Cecile Marcelot, Nicolas Large, Thameur Dammak and Kremena Makasheva, Detection of the conformational changes of Discosoma red fluorescent proteins adhered on silver nanoparticles-based nanocomposites via surface-enhanced Raman scattering // *Nanotechnology*, 2019, v. 30, n. 16
 15. Joanna Lukomska, Evgenia G. Matveeva, Ignacy Gryczynski, Robert W. Flower, Joanna Malicka, Joseph R. Lakowicz, Slawomir Makowiec, and Zygmunt Gryczynski, Enhanced fluorescence of labeled proteins coated on silver Nanoparticles // *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, v. 16, p. 7643–7648
 16. Hui Li, Weibing Qiang, Chongzhi Wang, Maika Vukib and Danke Xu Ultrasensitive and fast fluorescent bioassay based on fluorescence enhancement of silver nanoparticles // *The Analyst*, 2013, n.138(24)
 17. Do Hyeon Kim, Jeong Chan Park, Go Eun Jeon, Chang Sup Kim, and Jeong Hyun Seo, Effect of the Size and Shape of Silver Nanoparticles on Bacterial Growth and Metabolism by Monitoring Optical Density and Fluorescence Intensity // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, v. 22, p. 210–217
 18. Abdullah Alqudami and S Annapoorni, Fluorescence from metallic silver and iron nanoparticles prepared by exploding wire technique // *Plasmonics*, 2007,

v.2, p. 5–13

19. Li-Jun Zhao, Ru-Jia Yu, Wei Ma, Huan-Xing Han, He Tian, Ruo-Can Qian, Yi-Tao Long, Sensitive detection of protein biomarkers using silver nanoparticles enhanced immunofluorescence assay // *Theranostics*, 2017, n. 7(4), p. 876–883
20. Sourav Das, Leader Langbang, Mahabul Haque, Vinay Kumar Belwal, Kripamoy Aguan, Atanu Singha Roy, Biocompatible silver nanoparticles: An investigation into their protein binding efficacies, anti-bacterial effects and cell cytotoxicity studies // *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020
21. Hongling Wang, Xuejing Si, Tunhua Wu, Ping Wang Silver nanoparticles enhanced fluorescence for sensitive determination of fluoroquinolones in water solutions // *Open Chemistry*, 2019, n. 17, p. 884–892
22. Prof. Dr. Wolfgang Pompe Prof. Dr. Gerhard Rödel Prof. Dr. André Gorbunoff, Interaction of Metal Nanoparticles with Fluorophores and Their Effect on Fluorescence // Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, 2009
23. Sonit Kumar Gogoi, P. Gopinath, Anumita Paul, A. Ramesh, Siddhartha Sankar Ghosh, and Arun Chattopadhyay, Green Fluorescent Protein-Expressing *Escherichia coli* as a Model System for Investigating the Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles // *Langmuir*, 2006, n. 22, p. 9322–9328
24. Victor Banerjee, K.P. Das, Interaction of silver nanoparticles with proteins: A characteristic protein concentration dependent profile of SPR signal // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, v. 111, p. 71-79
25. Rinea Barbir, Ivona Capjak, Tea Crnkovi, Zeljko ˇ Debeljak, Darija Domazet Jura ˇ sin , Marija Curlin ´ , Goran Sinko , Tin Weitner, Ivana Vinkovi ´ Vr ˇ cek, Interaction of silver nanoparticles with plasma transport proteins: A systematic study on impacts of particle size, shape and surface functionalization // *Chemico-Biological Interactions*, 2021, v. 335
26. T Pérez-Ruiz, C Martínez-Lozano, V Tomás, J Fenoll, Determination of

- proteins in serum by fluorescence quenching of rose bengal using the stopped-flow mixing technique // *Analyst*, 2000, n.125(3), p. 507
27. John O. Onukwufor, Adam J. Trewin, Timothy M. Baran, Anmol Almast, Thomas H. Foster, Andrew P. Wojtovich, Quantification of reactive oxygen species production by the red fluorescent proteins KillerRed, SuperNova and mCherry // *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, v. 147, p. 1-7
28. Christian M. Wertheimer, Carolin Elhardt, Steffen M. Kaminsky, Linh Pham, Qing Pei, Bryan Mendes, Sepideh Afshar, Irene E. Kochevar, Enhancing Rose Bengal-Photosensitized Protein Crosslinking in the Cornea // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2019, v. 60, p. 1845-1852
29. Emilio Alarcón, Ana Maria Edwards, Alexis Aspé, Claudio D. Borsarellicand Eduardo A. Lissi, Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin // *Photochem Photobiol Sci*, 2009, n.8(7), p. 933
30. Tuğba Bayraktutan, Investigation of photophysical and binding properties of Rose Bengal dye on graphene oxide and polyethyleneimine-functionalized graphene oxide nanocomposites // *Chemical Papers*, 2020, v. 74, p. 3017–3024
31. María Beatriz Espeche Turbaya, Valentina Rey, Natalia M. Argañaraza, Faustino E. Morán Vieyra, Alexis Aspé, Eduardo A. Lissi, Claudio D. Borsarelli, Effect of dye localization and self-interactions on the photosensitized generation of singlet oxygen by rose bengal bound to bovine serum albumin // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, v. 141, p. 275-282
32. Robert W. Redmond, Irene E. Kochevar, Medical Applications of Rose Bengal- and Riboflavin-Photosensitized Protein Crosslinking // *Photochemistry and Photobiology*, 2019, n. 95(1)
33. Christopher P. Toseland, Fluorescent labeling and modification of proteins // *Journal of Chemical Biology*, 2013, n. 6(3), p. 85–95
34. Dmitriy M. Chudakov, Mikhail V. Matz, Sergey Lukyanov, and Konstantin

- A. Lukyanov, Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues // *Physiol Rev*, 2010, n. 90(3), p. 1103
35. Arne S. Kristoffersen, Svein R. Erga, Børge Hamre, Øyvind Frette, Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain Instrumentation: Fluorescein, Quinine Sulfate and Green Fluorescent Protein // *Journal of Fluorescence*, 2018, v. 28, p. 1065–1073
36. Ellen C. Jensen, Use of Fluorescent Probes: Their Effect on Cell Biology and Limitations // *The Anatomical record*, 2012, v. 295, i. 12, p. 2031-2036
37. Yoko Hayashi-Takanaka, Timothy J. Stasevich, Hitoshi Kurumizaka, Naohito Nozaki, Hiroshi Kimura, Evaluation of Chemical Fluorescent Dyes as a Protein Conjugation Partner for Live Cell Imaging // *PLoS One*, n. 9(9), 2014
38. Andrea Hawe, Marc Sutter, and Wim Jiskoot, Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization // *Pharmaceutical Research*, 2008, v. 25, p. 1487–1499
39. J. Iwatate, Akira Yoshinari, Noriyoshi Yagi, Marek Grzybowski, Profile Hiroaki Ogasawara, Mako Kamiya, Toru Komatsu, Masayasu Taki, Shigehiro Yamaguchi, Wolf B. Frommer, Masayoshi Nakamura, Self-labeling of proteins with chemical fluorescent dyes in BY-2 cells and Arabidopsis seedlings // *The Plant Cell*, 2020, n. 32(10), p.3081–3094
40. Susan Bingaman, Virginia H Huxley, Rolando E Rumbaut, Fluorescent dyes modify properties of proteins used in microvascular research // *Microcirculation*, 2003, n. 10(2), p. 221
41. P. G. Pronkin, A. S. Tatikolov, Spectral and Fluorescent Studies of the Interaction of an Anionic Oxacarboxyanine Dye with Bovine Serum Albumin // *Journal of Applied Spectroscopy*, 2017, v. 83, p. 938–944
42. Nethaniah Dorh, Shilei Zhu, Kamal B. Dhungana, Ranjit Pati, Fen-Tair Luo, Haiying Liu & Ashutosh Tiwari, BODIPY-Based Fluorescent Probes for Sensing Protein Surface-Hydrophobicity // *Scientific Reports*, 2015, v. 5
43. Manik Waghmare, Bipin Khade, Pradip Chaudhari, Prabhakar Dongre, Multiple layer formation of bovine serum albumin on silver nanoparticles

- revealed by dynamic light scattering and spectroscopic techniques // *Journal of Nanoparticle Research*, 2018, v. 20
44. Chinmayee Pradhan, Subhankar Paul, Investigation of the Role of Silver Nanoparticles in BCA Protein Misfolding Process // 2011 International Conference on Nanoscience, Technology and Societal Implications, 2011
45. Claudia Kastner, Linda Böhmert, Albert Braeuning, Alfonso Lampen, and Andreas F. Thünemann, Fate of Fluorescence Labels Their Adsorption and Desorption Kinetics to Silver Nanoparticles // *Langmuir*, 2018, n.34, v. 24, p. 7153–7160
46. Vinod D. Jaiswal, P. M. Dongre Biophysical interactions between silver nanoparticle-albumin interface and curcumin // *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, v. 10, i. 2, p. 164-177
47. Gongke Wang, Yanfang Lu, Huimin Hou and Yufang Liu, Probing the binding behavior and kinetics of silver nanoparticles with bovine serum albumin // *ACS Omega*, 2020, n. 5, i. 1, p. 170–178
48. Nadia Barbero, Ermanno Barni, Claudia Barolo, Pierluigi Quagliotto, Guido Viscardi, Lucia Napione, Simona Pavan, Federico Bussolino, A study of the interaction between fluorescein sodium salt and bovine serum albumin by steady-state fluorescence // *Dyes and Pigments*, 2009, v. 80, i. 3, p. 307-313
49. K. Schauenstein, E. Schauenstein And G. Wick, Fluorescence Properties Of Free And Protein Bound Fluorescein Dyes // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1977, v. 179, i. 2, p. 672-681