

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

МАГИСТЕРСКАЯ РАБОТА

**Спектроскопические исследования взаимодействия наночастиц с
белками**

Выполнил студент
205М 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-2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1	6
1.1 Физические основы флуоресцентной спектроскопии.	6
1.2 Спектры флуоресценции	12
1.3 Механизмы тушения флуоресценции. Динамическое и статистическое тушение. Метод Штерна - Фольмера.	14
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 исследованиях изменения пространственной структуры белка.	21
ГЛАВА 2	34
МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	34
2.1 Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина для изучения его флуоресцентных характеристик в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра и золота.	34
2.2 Приготовление растворов бычьего сывороточного альбумина для изучения изменения его диаметра в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра и золота.....	35
2.3 Методика экспериментов на спектрофлуориметре для изучения флуоресцентных характеристик и констант тушения флуоресценции бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц металлов.....	36
2.4 Методика экспериментов на спектрофотометре для изучения спектров поглощения бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц серебра и золота.....	36
2.5 Методика экспериментов на корреляционном спектрографе для изучения динамики изменения размеров бычьего сывороточного альбумина в растворах бенгальского розового и наночастиц металлов	37
ГЛАВА 3	38
3.1 Исследование спектров флуоресценции белка в растворах, содержащих флуоресцентный маркер и наночастицы золота и серебра	38
3.2 Определение характеристик поляризованной люминесценции красителя семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина с наночастицами металлов.....	43
3.3 Анализ спектров поглощения исследуемых растворов при различных значениях рН	44
3.4 Определение размеров частиц золота и серебра в буферных растворах и в растворах, содержащих бычий сывороточный альбумин и флуоресцентный маркер	47
3.5 Исследования синхронных спектров флуоресценции растворов сывороточного альбумина с наночастицами металлов	48
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	52
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ	62
ПРИЛОЖЕНИЕ	63

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

SA	сывороточный альбумин
BSA	бычий сывороточный альбумин
HSA	сывороточный альбумин человека
SNP	наночастицы серебра
GNP	наночастицы золота
BR	бенгальский розовый
VV	параллельная электрическому вектору возбуждающего света компонента поляризованной флуоресценции
VH	перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света компонента поляризованной флуоресценции

ВВЕДЕНИЕ

Процесс изменения пространственной структуры белка вызывает большой интерес в различных областях медицины, фармацевтики, биофизики. Для исследования данного явления чаще всего применяют спектроскопический метод. Под ним подразумевается получение и анализ различных спектров: поглощения, флуоресценции, поляризованной флуоресценции и синхронных спектров. Для анализа изменения гидродинамического радиуса белка под воздействием внешних факторов применялся метод гидродинамического рассеяния света.

В данной работе изучены изменения спектрально-люминесцентных характеристик бычьего сывороточного альбумина (BSA) и красителя при связывании с наночастицами серебра и золота при различных рН среды. Альбумины – это семейство простых водорастворимых белков, денатурирующих при нагреве, при изменении каких-либо факторов, окружающих их среды, например, кислотности раствора, и т.д. Белки данного семейства составляют от 55% до 60% всех белков плазмы крови. Они формируются в печени живых существ и выполняют ряд крайне важных для функционирования организма задач. Они отвечают за поддержание коллоидно-осмотического давления, а также за перенос питательных веществ, ядов и лекарств, что делает их крайне востребованными в различных биофизических и фармацевтических исследованиях. Например, подобного рода научные изыскания могут быть полезны в поиске медикаментозного способа лечения онкологических заболеваний. В данной работе в качестве объекта исследования использовался бычий сывороточный альбумин. Поскольку его структура на 80% совпадает с сывороточным альбумином человека, то его изучение играет важную роль для биомедицинских исследований. Кроме того, структура BSA крайне отзывчива к изменению рН окружающей среды. Изоэлектрическая точка BSA рI 4,9. При повышении рН среды относительно изоэлектрической точки белок принимает отрицательный заряд, а при понижении – положительный. Также, при падении рН от 4,7 до

3,0 структура BSA раскрывается, за счет этого межмолекулярное взаимодействие снижается. pH влияет и на вторичную структуру BSA: относительные содержания α -спиралей и β -слоев не изменяются при снижении pH с 7,0 до 4,0. В области $3,0 < \text{pH} < 4,0$ при увеличении pH относительное содержание α -спирали значительно уменьшается. Также гидрофобность BSA меняется вместе с изменением pH среды.

В качестве флуоресцентного маркера использовался краситель бенгальский розовый (BR), который при различных pH существует в разных формах: при $\text{pH} > 4,0$ бенгальский розовый находится в форме дианиона и обладает сильно отрицательным зарядом, в промежутке от 2,6 pH до 4,0 pH данный краситель принимает форму моноаниона и обладает отрицательным зарядом, при $\text{pH} < 2,6$ бенгальский розовый электрически нейтрален. Выбор в качестве флуоресцирующего наномаркера бенгальского розового обусловлен тем, что семейство флуоресцеинов, к которому относится данный краситель, в дианионной форме почти не производит безызлучательных переходов с S_1 на S_0 и T.

В качестве наночастиц металлов использовались наночастицы серебра с диаметром 12 нм и наночастицами золота диаметром 11 нм. Значения их электроотрицательности, согласно шкале Полинга, равны 1,93 и 2,53 $\text{eV}^{-1/2}$, соответственно. Выбор данных металлов обусловлен их высокой популярностью в различных биомедицинских, биофизических и фармацевтических исследованиях. NP благородных металлов обладают широким спектром антимикробных свойств против патогенов, в том числе бактерий и вирусов. В настоящее время NP применяются при терапии рака, что развивает новую область противоопухолевой медицины — наномедицину рака. По сравнению с традиционными противоопухолевыми средствами металлические NP могут быть использованы как новые терапевтические агенты или носители в комбинации с лекарственными средствами, обеспечивающие их целенаправленную доставку. За связывание молекул металлов с белком отвечает VI центр связывания.

ГЛАВА 1

1.1 Физические основы флуоресцентной спектроскопии.

Люминесценция – явление нетеплового свечения вещества под воздействием возбуждающего излучения. Для перехода молекул вещества из основного состояния в возбужденное требуется передача энергии. Обратный же переход, т.е. из возбужденного в основное, вызывающий свечение, и называется люминесценцией.

Люминесценция в зависимости от способа возбуждения разделяется на не сколько типов (фотолюминесценция, катодолюминесценция, рентгенолюминесценция и т.д.), в данной работе используется фотолюминесценция вещества, поэтому рассмотрим ее более подробно.

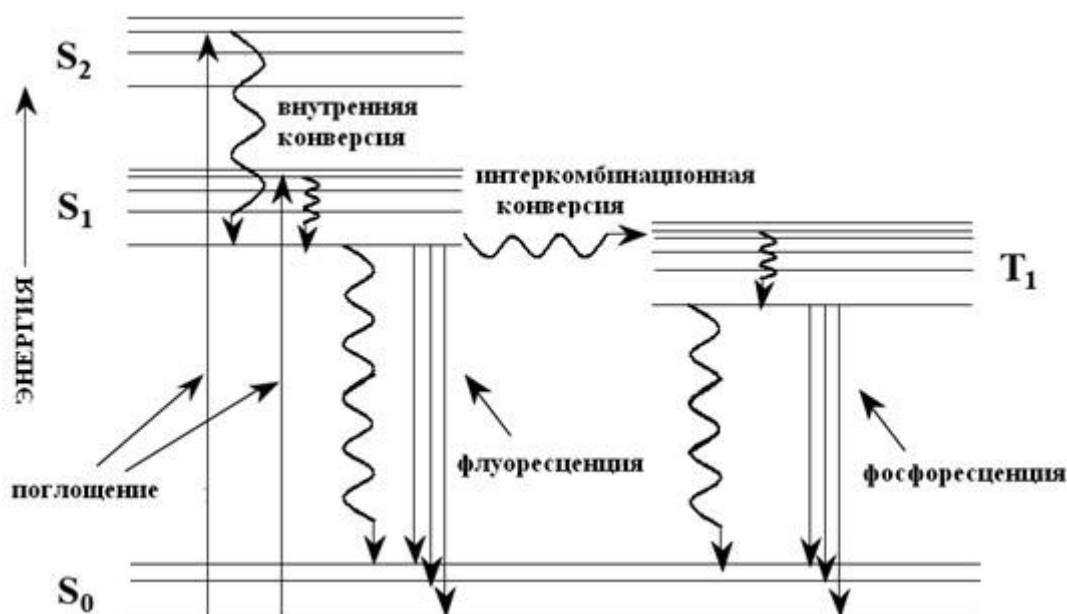


Рис. 1.1 Диаграмма Яблонского для энергетических уровней молекулы. Стрелками обозначены основные процессы преобразования энергии фотовозбуждения в молекуле

Фотолюминесценция – нетепловое свечение вещества, происходящее при возбуждении молекул исследуемого объекта при помощи электромагнитного излучения оптической частоты. В зависимости от природы возбужденного электронного состояния и времени свечения фотолюминесценция делится на два основных типа: флуоресценцию и фосфоресценцию. Рассмотрим по отдельности каждый из них. Флуоресценция - свечение, которое возникает при переходе между энергетическими уровнями

одинаковой мультиплетности (с первого S_1 , или реже – с второго возбужденного синглетного уровня S_2 , на основной синглетный уровень S_0). Время свечения крайне мало и составляет $\sim 10^{-9}$ сек. Столь непродолжительное «послесвечение» связано с коротким временем жизни молекулы в синглетном возбужденном состоянии и высокой вероятностью перехода частиц в основное состояние. В свою очередь время свечения фосфоресценции достаточно продолжительно, чтобы быть различимым для человеческого глаза и составляет $>10^{-6}$ сек. Данное явление возникает при переходах между энергетическими уровнями различной мультиплетности (при переходах с первого триплетного T_1 на основной синглетный уровень S_0). В данном случае времена жизни триплетного состояния достаточно продолжительно, а вероятность подобного перехода крайне мала, что приводит к крайне малому показателю значения константы свечения фосфоресценции, что и является основной причиной более продолжительного, по сравнению с флуоресценцией, свечения (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 принято называть зависимость показателя поглощения вещества (коэффициента экстинкции ϵ) (характеризующий то, насколько сильно вещество поглощает свет на выбранной длине волны) от длины волны λ (или от волнового числа ν). Под спектрами возбуждения следует понимать функцию распределения излучаемой веществом энергии в зависимости от длины волны (или частоты) возбуждения. В свою очередь, спектр люминесценции- функция распределения по длинам волн или частотам излучаемой веществом энергии.

У молекулярная люминесценция есть важная закономерностью, проявляющейся во взаимном расположении спектров люминесценции и поглощения. Раньше данная зависимость описывалась правилом Стокса, которое гласит, что частота возбуждающего света больше или равна частоте люминесценции:

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

Важно помнить, что данное утверждение верно исключительно для атомов и простых молекул, находящихся в газообразном состоянии, которые называются стоксовыми, поскольку для них закон Стокса выполняется. Вещества, для которых правило Стокса не выполняется, принято называть антистоксовыми. 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, была названа законом Стокса – Ломмеля и имеет следующий вид:

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

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

Явление фотолюминесценция появляется при поглощении молекулами вещества энергии возбуждающего света, очевидно, что не вся эта энергия преобразуется в энергию люминесценции. Для оценки эффективности данного процесса, было введено понятие выхода люминесценции. Существует квантовый и энергетический выход люминесценции. Энергетическим выходом люминесценции называется отношение энергии, испускаемой в виде люминесценции $E_{\text{л}}$, к энергии поглощенного возбуждающего света $E_{\text{п}}$:

$$B_{\text{эн}} = E_{\text{л}}/E_{\text{п}}$$

Квантовым выходом люминесценции принято называть отношение числа испущенных квантов люминесценции $N_{\text{л}}$ к числу квантов возбуждающего света $N_{\text{п}}$:

$$B_{\text{кв}} = N_{\text{л}}/N_{\text{п}}$$

Зная, что энергия кванта равна $h\nu$, нетрудно получить зависимость между

энергетическим и квантовым выходом:

$$B_{\text{ЭН}} = (N_{\text{л}}/N_{\text{п}})(h\nu_{\text{л}}/h\nu_{\text{п}}) = B_{\text{КВ}} (\nu_{\text{л.ср.}}/\nu_{\text{п.ср.}}),$$

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

$$B_{\text{ЭН}} < B_{\text{КВ}}.$$

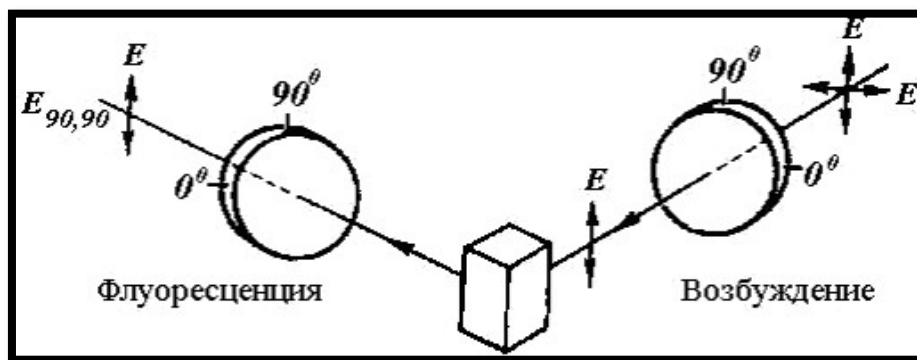


Рис. 1.2 Схема измерения поляризованной флуоресценции.

С. И. Вавилов показал, что энергетический выход люминесценции растворов органических веществ $\sim 0,8$. В этом случае, $B_{\text{КВ}}$ 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 стоковыми.

Так как молекулы люминесцирующих веществ оптически анизотропные, то люминесцентное излучение каждой такой частицы частично поляризовано. Стоит отметить, что, у большинства сложных органических соединений анизотропные молекулы ориентированы хаотично, следовательно, такое вещество в целом становится изотропным, а его люминесценция – неполяризованной. Таким образом, для возникновения поляризации люминесценции необходима анизотропия ориентационного распределения излучателей, которая может быть обусловлена как внутренними (типом кристаллической решетки или пленками красителей), так и внешними факторами (путем воздействия излучения на вещество) (рис. 1.2).

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

Важно помнить, что при возбуждении поляризованным светом электрический вектор преимущественно сонаправлен с направлением возбуждающего света. Кроме того, если возбуждающим светом облучается агломерация частиц, дипольные моменты которых параллельны друг другу, их люминесценция будет полностью поляризована. Для определения меры поляризации вещества вводят понятия степени поляризации и степени анизотропии.

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 компоненты поляризованной флуоресценции.

Позже было введено понятие степени анизотропии излучения:

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

Основным различием данных характеристик является тот факт, что в отличие от степени поляризации, у которой в знаменателе стоит значение интенсивности люминесценции в определенном направлении, в знаменателе степени анизотропии используется величина пропорциональная суммарному значению интенсивности. По этой причине, степень анизотропии дает более полное и корректное представление процессов поляризованной люминесценции.

Также между этими двумя величинами нетрудно увидеть следующую зависимость:

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

Впервые 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

представима в следующем виде:

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

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

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

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

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

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

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

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 I/P и T/η . Откладывая на оси ординат I/P , а по оси абсцисс T/η получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный I/P_0 .

Тангенс угла наклона ϕ этой прямой к оси абсцисс:

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

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 основе метода флуоресцентной спектроскопии лежит анализ различного рода спектров. Спектры поглощения, подразумевают под собой зависимость коэффициента поглощения от длины волны (или от волнового числа ν). Спектры поглощения позволяют провести комплексный анализ рассматриваемого вещества. Вид спектра поглощения крайне чувствителен к различного рода факторам, характеризующих исследуемый образец. К их числу можно приписать: агрегатное состояние исследуемого вещества, природа образующих его молекул, температура объекта и т.д. Связь между спектрами поглощения и люминесценции была установлена Б.И. Степановым, и имеет 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:

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

Спектр флуоресценции – это функция распределения излучаемой веществом энергии по длинам волн или частотам. Важнейшей закономерностью молекулярной люминесценции является зависимость 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:

$$I_{\text{исп}} = nh\nu_{\text{исп}} \int \rho(E_{\text{кол}}^*) f(E_{\text{кол}}^*, \nu) dE_{\text{кол}}^* \quad (1)$$

, где $E_{\text{кол}}^*$ – колебательный подуровни верхнего электронного состояния, $f(E_{\text{кол}}^*, \nu)$ – вероятность перехода на высшее энергетическое состояние. Итак, в уравнении (1) 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.

С. И. Вавилов назвал зависимость степени поляризации от частоты волны возбуждения при фиксированной длине волны испускания поляризованным спектром. Данные спектры крайне функциональны для исследования 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, а также 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 при фиксированной разнице между длиной волны возбуждения и длиной волны регистрации. 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 небольшую 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. Важной особенностью для данной работы, является тот факт, что синхронные спектры флуоресценции могут давать информацию об остатках тирозина и триптофана в белках [1-3].

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

Различные внутренние и внешние факторы могут привести к уменьшению выхода люминесценции исследуемых веществ, что, в свою очередь, приводит к тушению свечения исследуемых молекул. Известно большое число видов процессов тушения люминесценции, отличающихся по природе своего возникновения. Например: температурное, посторонними примесями, концентрационное и др.

Все типы тушения люминесценции разделяются на два вида. Тушением первого рода принято называть процессы, в которых выход люминесценции уменьшается при воздействиях на невозбужденные молекулы вещества (такой тип тушения также принято называть статистическим). Под тушением второго рода следует подразумевать процессы, в которых выход люминесценции уменьшается при воздействии на возбужденные молекулы вещества.

При тушении люминесценции первого рода средняя длительность возбужденного состояния молекул τ не изменяется, 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 веществ, 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:

$$B_0/B = 1 + K_d C_T,$$

где K_d – константа динамического тушения, C_T – концентрация тушителя, B_0 и B – выход люминесценции в отсутствие и при наличии тушения соответственно.

Статистическое тушение связано с образованием нефлуоресцирующих комплексов в основном состоянии. Статистическое тушение также описывается уравнением типа Штерна-Фольмера, но константа тушения представляет собой константу равновесия образованного комплекса.

$$B_0/B = 1 + K_{ст} C_T,$$

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

1.4 Метод Бенези – Хильдебранда

Метод Бенези – Хильдебрана – это математический метод, использующийся в физической химии для определения константы ассоциации K_{app} , являющейся показателем степени связывания рассматриваемых смесей.

Рассмотрим следующую равновесную систему:



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

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

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. 1 – 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:

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

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 и K_{app} .

1.5 Бычий сывороточный альбумин.

Бычий сывороточный альбумин (BSA) - глобулярный белок семейства сывороточных альбуминов (СА, составляющие до 60% от всех белков в плазме крови), к этому семейству также относится сывороточный белок человека (САЧ). Значение изоэлектрической точки для BSA равна 4,9, молекулярная масса BSA равна 64 кДа.

Сывороточный альбумин составляет основную долю от всех белков плазмы крови организма. Он синтезируется в печени и выполняет ряд важных физиологических функций, а именно: поддержание коллоидно-осмотического давления и транспорт физиологических метаболитов (гормоны, витамины, яды и прочее). В плазме крови существует несколько белков, осуществляющих транспортную функцию, но только сывороточный альбумин способен присоединять обратимо такой широкий круг лигандов. Последняя из вышеперечисленных функций SA представляет особый интерес по причине

осуществления переноса не только продуктов жизнедеятельности организма, например: холестерина, кальция, билирубина, уробилина, 23 желчных элементов, а также ядов, лекарств (некоторые виды антибиотиков, пенициллин, гормоны, сульфаниламид, варфарин, фенитоин, и др.).

Как и любой белок семейства альбуминов, BSA состоит из аминокислотных остатков. Первичная структура SA определяется единственной полипептидной цепью каждого белка. Она состоит из 582 для BSA аминокислотных остатков. При изучении и сопоставлении BSA и HSA [5] было обнаружено 75% совпадение, то есть бычий сывороточный альбумин и человеческий SA имеют схожую способность к присоединению разных лигандов, что делает BSA почти идеальным кандидатом для медицинских исследований. Вторичная структура BSA состоит по большей части α -спиральные участки и участки хаотической укладки при физиологическом значении pH (7,4), но также присутствуют β складчатые структуры.

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

За транспорт разных структурных классов лигандов молекулой SA отвечают различные специфичные центры связывания. В частности, есть шесть главных связывающих центров HSA: 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]

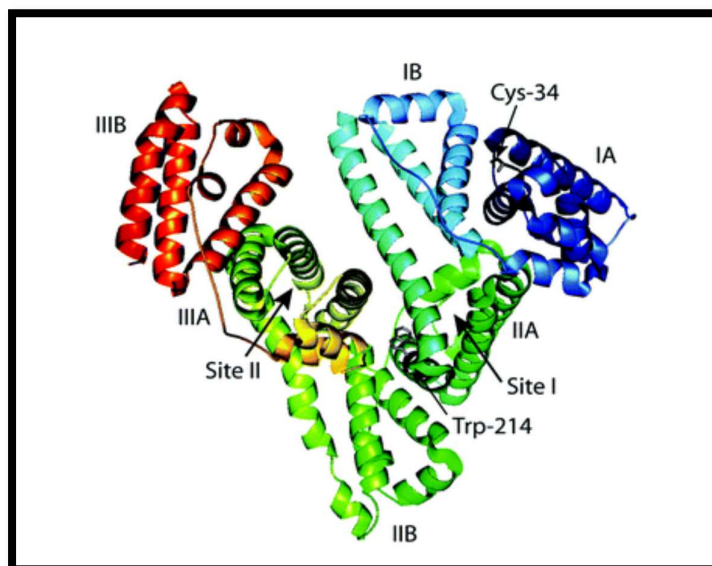


Рис. 1.3 Доменная структура сывороточного альбумина

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 pH 7,4 флуоресцентные

наномаркеры семейства флуоресцеина (флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый), соединяющиеся непосредственно с ним. Структурные формулы данных флуоресцентных зондов представлены ниже (рис. 1,4) 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 S1 на S0 и T почти не происходят.

Для флуоресцентного зонда БР $pK(\text{ОН}) = 2,6$, $pK(\text{COOH}) = 4,0$. 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.

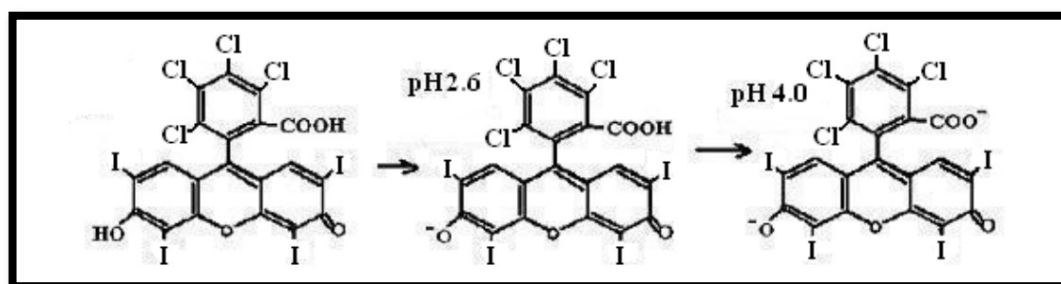


Рис. 1.4 Структурная формула бенгальского розового и значения pK ионизированных групп

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 хаотичное 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 того, 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 теоретической 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 1.3)

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 1.3)

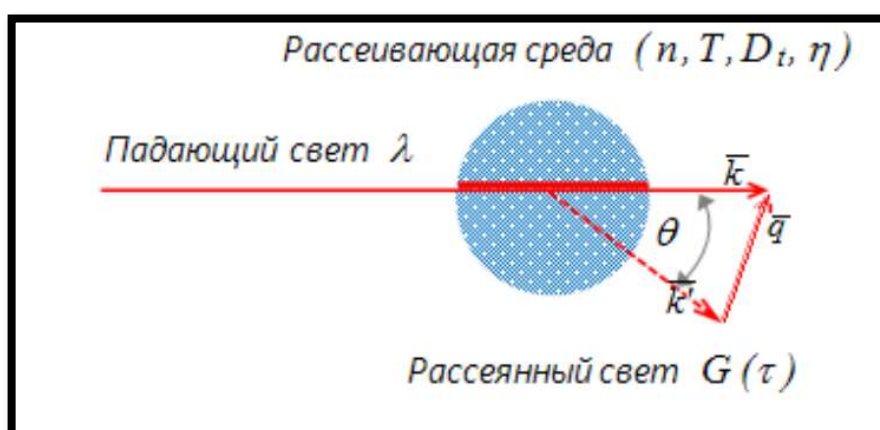


Рис 1.5 Схема процесса рассеяния света

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 исследованиях изменения пространственной структуры белка.

Процесс взаимодействия BSA 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, для выявления различного рода новообразований в человеческом организме, например, раковых опухолей или меланом.

В работе [6] была описана роль рекомбинантного человеческого коллагена I-го типа в свободной форме или в связи с SNP на фотофизическое и фотохимическое поведение бенгальского розового. Было обнаружено образование агрегатов красителя на поверхности белка.

В работе [7] исследуются взаимодействия между пептидом грамицидин А (GramA) и малыми наночастицами серебра, стабилизированными додекантиолом. 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 исследование процесса адсорбции бычьего сывороточного альбумина (BSA) на поверхности наночастиц серебра (SNP), получение мягких конъюгатов (SC) и твердых конъюгатов (HC) функционализированных BSA SNP (SNP-BSA), и их взаимодействия с куркумином (CUR).

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

В работе [10] рассматриваются взаимодействия между белком BSA и SNP, исследованные с использованием спектроскопических методов. Показано, что BSA взаимодействует с SNP с образованием стабильного комплекса BSA-SNP. В то же время результаты подразумевают, что

взаимодействие SNPs с BSA может быть самопроизвольным, в котором основными действующими силами являются водородные связи и гидрофобные взаимодействия.

В работе [11] рассматривается взаимодействие между наночастицами серебра (SNP) и бычьим сывороточным альбумином (BSA) 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 BSA посредством как статических, так и динамических механизмов гашения.

В работе [12] использовали SNP 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 BSA.

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 с помощью SERS после адсорбции, взаимодействия и дегидратация белков на твердой поверхности плазмонного субстрата на основе SNP.

В исследовании [15] рассматривается влияние размера коллоидных систем 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 (SNP) в зависимости от их размеров и формы на зеленом флуоресцентном белке (GFP). При измерениях оптической плотности и

интенсивности флуоресценции рекомбинантного 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 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 Ag. Синтез НЧ 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 AGP (α -1-acid гликопротеин) обладает сходным с BSA 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 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 и 1O_2 . В этой работе демонстрируется образование FO_2 , F^1O_2 и скорости образования O_2 . Результаты данного исследования помогут выяснить механизмы, связанные с 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 глаза. Результаты данного исследования показали, что РБ 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 БР сильно различается в водном растворе и при связывании с HSA. Кроме того, данные также показывают, что поведение связанных молекул БР изменяется в зависимости от среднего количества молекул красителя, связанных с белком.

В исследовании [30] рассматриваются фотофизические свойства

бенгальского розового с использованием методов поглощения в оптически-видимой области и флуоресцентной спектроскопии в двух различных условиях реакции, а именно в растворах дисперсии нанокompозита полиэтиленimina с оксидом графена (PEI-GO) и в растворах нанокompозита с высоким содержанием COOH. Нанокompозит PEI – GO имел положительно заряженную поверхность, содержащую функциональную группу –CONH, которая была модифицирована ковалентными связями. Обнаружено, что молекулярные взаимодействия красителя в этих средах различны.

В работе [31] были исследованы спектроскопические и фотофизические свойства бенгальской розы (BR), заключенной в бычий сывороточный альбумин (BSA), для оценки фотосенсибилизированного образования синглетного молекулярного кислорода (1O_2). Результаты показывают, что фотофизические и фотосенсибилизирующие свойства BR сильно зависят от среднего числа молекул красителя на белок.

В исследовании [32] суммируются исследования многих потенциальных применений фотосенсибилизированного 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.

В работе [34] рассматривается зеленый флуоресцентный белок (GFP) медузы *Aequorea Victoria*, который широко используется в качестве универсальной флуоресцентной метки. Авторы акцентируют внимание на роли флуоресцентных красителей в промышленности и медицине, отдельно рассматривая структуру, эволюцию и функции GFP-подобных белков, и их многочисленные применения для визуализации белков, уделяя особое внимание новейшим методам.

В исследовании [35] были протестированы три часто используемых образца: флуоресцеин, сульфат хинин и зеленый флуоресцентном белке. Особенное внимание акцентировалось на их пригодности для измерения двухфотонного возбуждения во временной области.

В работе [36] обсуждаются особенности и проблемы, которые могут возникнуть при работе с различными флуоресцентными соединениями, использующихся 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 применения 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 (BSA) и альфа-лактальбумина.

В работе [41] изучено влияние образования нековалентных межмолекулярных комплексов с бычьим сывороточным альбумином (BSA) 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 BSA на наночастицах серебра (SNP).

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 (pH и объема экстракта винограда).

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

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

В работе [47] исследуется взаимодействие модельного белка, бычьего сывороточного альбумина (BSA), с наночастицами серебра (SNP) с использованием спектров флуоресценции, синхронной флуоресценции, поглощения ультрафиолетового (УФ) излучения, (FT-IR) и кругового дихроизма (CD) в водных растворах.

В работе [48] представлены свидетельства новых аспектов, касающихся связывания BSA с лигандом (натриевой солью флуоресцеина).

Эти результаты являются новыми в области исследования связывания BSA и показывают, что эксперименты с участием BSA должны проводиться очень осторожно из-за большого количества 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.

В работе [50] авторы рассматривают нанокластеры золота, встроенные в бычий сывороточный альбумин, с помощью непрерывного волнового электронного парамагнитного резонанса и просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения.

Исследование [51] демонстрирует потенциал использования нетоксичных флуоресцентных нанокластеров золота для целенаправленной визуализации рака.

В работе [52] была проанализирована сила взаимодействия наночастиц золота и серебра с различными красителями и молекулами бычьего сывороточного альбумина, также были проанализированы антибактериальные свойства молекул данных металлов.

Работа [53] посвящена исследованию адсорбции бычьего сывороточного альбумина на наночастицах золота с различными модификациями поверхности спектральными методами.

В работе [54] представлены наблюдения за адсорбцией бычьего сывороточного альбумина на стабилизированных цитратом золотых наносферах. В данном исследовании корреляционную спектроскопию рассеяния использовали в качестве инструмента для количественной оценки изменений в броуновском движении наночастиц, возникающих в результате адсорбции BSA на поверхности наночастиц золота.

В работе [55] дается сравнительная характеристика между молекулами золота и платины, в качестве потенциальных оснований для фармакологических средств.

Работа [56] посвящена исследованию изменения эффективности и антиоксидальной активности противоопухолевых аппаратов при использовании в них наночастиц золота.

В работе [57] была разработана и использована новая стратегия

фотокаталитического синтеза для быстрого получения нанокластеров белок-золото с перестраиваемой флуоресценцией.

Работа [58] посвящена исследованию взаимодействия покрытых гистидином нанокластеров золота с бычьим сывороточным альбумином методами флуоресценции, УФ–визирования, кругового дихроизма (CD) и рамановской спектроскопии в имитационных физиологических условиях.

В работе [59] описывается биофункционализация наночастиц благородных металлов, таких как золото и серебро, необходимая для получения биосовместимости для конкретных биомедицинских применений.

Работа [60] посвящена исследованию покрытых BSA нанокластеров золота различными оптическими методами. Данное исследование концентрируется на использовании наночастиц золота в качестве фотосенсибилизаторов.

В работе [61] приводится исследование взаимодействия между биосинтезированными наночастицами золота и бычьим сывороточным альбумином с помощью мультиспектроскопического подхода.

В работе [62] рассматриваются нанокластеры/наночастицы золота, конъюгированные с бычьим сывороточным альбумином (BSA), синтезированные в воде при комнатной температуре методом зеленого синтеза.

В работе [63] приведен обзор недавнего прогресса в области биологических исследований наночастиц золота на молекулярном и клеточном уровнях, а также представлены ключевые методы для изучения взаимодействия между наночастицами золота и белками.

В работе [64] рассматривается многослойное взаимодействие белок-белок в убиквитиновой короне на поверхности золотых наностержней. Взаимодействие убиквитина с золотыми наностержнями было охарактеризовано с помощью УФ–видимой спектроскопии, методом динамического рассеяния света и измерений дзета-потенциала.

В работе [65] было изучено влияние белка бычьего сывороточного

альбумина (BSA) на различные свойства наночастиц золота. Образцы были проанализированы с помощью адсорбционной спектрофотометрии, флуоресцентной спектрофотометрии, анализа размера частиц и СЭМ-анализа.

Работа [66] посвящена флуоресцентному переключению на основе нанокластеров золота, стабилизированных бычьим сывороточным альбумином, и аптамером канамицина и способам его применения.

В работе [67] оценивается возможность использования комплекса BSA-золото для обнаружения внутриклеточной перекиси водорода. Анализ производился при помощи спектрально-люминесцентных методов.

В работе [68] при помощи спектроскопии флуоресценции и инфракрасной Фурье - спектроскопии исследовались оптические свойства и конформационные изменения комплекса «BSA+GNP», вызванные температурой.

В работе [69] представлено всестороннее исследование структурных изменений молекул бычьего сывороточного альбумина с помощью методов инфракрасной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния.

В работе [70] представлен анализ спектров инфракрасной Фурье - спектроскопии и кругового дихроизма (CD) для мониторинга изменений вторичной структуры лиганда BSA.

В работе [71] рассматривается флуоресцентный переключатель BSA-AuNCs, который может быть использован для обнаружения цистеина и Cu^{2+} в мозге мышей с болезнью Альцгеймера.

Работа [72] посвящена использованию нанокластеров золота в качестве фотолуминесцентных зондов для визуализации опухолей. В раковых клетках наночастицы золота окружены биомолекулами, которые могут адсорбироваться или взаимодействовать с клетками опухоли и, следовательно, влиять на клеточный метаболизм. Для исследования этого взаимодействия используются спектрально-люминесцентные методы.

В работе [73] проверяется теория, согласно которой: наночастицы золота являются жизнеспособной альтернативой органическим флуорофорам или

полупроводниковым наночастицам для биологической маркировки и визуализации.

Работа [74] посвящена исследованию бычьего сывороточного альбумина в качестве покрывающего и стабилизирующего агента для производства, а также его использованию для контроля размера биоконъюгированных наночастиц золота.

В работе [75] рассматривается фотолюминесценция наночастиц золота, покрытых бычьим сывороточным альбумином, в зависимости от pH раствора.

Работа [76] рассматривает возможность использовать альбумин для приготовления многослойного покрытия наночастиц золота для уменьшения неспецифических белковых взаимодействий в биологических средах.

В работе [77] показано, что, используя различное время рентгеновского облучения наночастиц золота, покрытых BSA, можно изменить их фотолюминесценцию, стимулируемую ультрафиолетом.

В работе [78] при помощи УФ-видимой спектроскопии поглощения, спектрально-люминесцентные методы и FT-IR в сочетании со спектроскопией ослабленного полного отражения были исследованы взаимодействия между бычьим сывороточным альбумином и наночастицами золота, а также конформационные изменения BSA, вызванные этим взаимодействием.

В работе [79] рассматривается исследование взаимодействие между наночастицами золота 40 и 60 нм с BSA с помощью УФ-абсорбционной спектрофотометрии, флуоресцентной спектроскопии и инфракрасной Фурье - спектроскопии.

В работе [80] представлено исследование, демонстрирующее вызванные различными pH буфера изменения флуоресценции нанокластеров золота, покрытых BSA, и соответствующие конформационные изменения белка-лиганда с помощью флуоресценции, кругового дихроизма (CD) и ИК-спектральных измерений.

В работе [81] описывается процесс синтеза и последующего анализа с использованием спектрофотометра, а также метода динамического рассеяния

света небольших наночастиц золота размерами порядка 5 нм, покрытых бычьим сывороточным альбумином.

Работа [82] посвящена систематическому исследованию действия BSA в качестве стабилизатора наночастиц золота.

Работа [83] подчеркивает важность детального изучения взаимодействий между коллоидами (наночастицами и нанокластерами) благородных металлов с сывороточными альбуминами в связи с их быстро растущим присутствием в биомедицинских исследованиях.

Итак, изучение спектроскопических исследований взаимодействия наночастиц с белками представляют большой интерес в различных направлениях биологии, химии и биофизики. Основной причиной тому, очевидно, является широкое применение подобного рода исследований в создании более эффективных лекарств и ядов. А также могут дать человечеству способ лечить такие тяжелые заболевания, как рак, практически на любой его стадии без применения лучевой и химио терапии, которые, к сожалению, обладают высокой стоимостью и могут нанести огромный вред пациенту.

ГЛАВА 2 МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТА

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

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 флуоресцентных характеристик 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; 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 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 нМ, 0,4 нМ и 0,6 нМ) 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 нМ, 0,4 нМ и 0,6 нМ) 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 и золота.

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 гидродинамического радиуса 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 и 6 мкМ);
- 3) раствор наночастиц серебра (50 мкМ)
- 4) раствор наночастиц с золота (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 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 нМ, 0,4 нМ и 0,6 нМ) 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 нМ, 0,4 нМ и 0,6 нМ) и при шести значениях pH буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 pH);

- 5) система «наночастицы золота + белок + буфер», при трех концентрациях белка (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ) и трех концентрациях золота (0,2 нМ, 0,4 нМ и 0,6 нМ) и при шести значениях pH буфера (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 ;7,0 и 8,0 pH);
- 6) система «краситель+ наночастицы золота + 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 золота (0,2 нМ, 0,4 нМ и 0,6 нМ) 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 металлов

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 $\lambda_{\text{возб}} = 295$ 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 $\lambda_{\text{возб}} = 295$ 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 и золота

Исследования спектров поглощения бычьего сывороточного альбумина, как в растворах с бенгальским розовым и наночастицами серебра и золота, так и в растворах без примесей проведены с помощью спектрофотометра SOLAR PV 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 металлов

Размеры систем, образующихся при взаимодействии бычьего сывороточного альбумина при различных показателях рН среды с молекулами бенгальского розового и наночастицами серебра и золота 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 3

3.1 Исследование спектров флуоресценции белка в растворах, содержащих флуоресцентный маркер и наночастицы золота и серебра

В ходе данной работы были исследованы спектрально – флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина при различных рН в буферных растворах при добавлении наночастиц серебра, золота и флуоресцентного красителя – бенгальского розового. Были получены спектры флуоресценции BSA различных концентраций при изменении рН раствора, при изменении концентраций наночастиц серебра, золота и BR. В качестве примера приведены спектры флуоресценции BSA (50 мкМ) при различных значениях рН (от 3,5 до 8,0) рис.3.1 и спектры флуоресценции растворов сывороточного альбумина, содержащие различные наночастицы металлов и маркера(рис.3.2).

Как видно на рисунка 3.1 значение пика флуоресценции растет от 3,5 рН достигая своего максимального значения при рН 5,0, на промежутке рН > 5,0 наблюдается падение интенсивности флуоресценции BSA. Данное явление связано с изменением пространственной структуры белка, которая, раскрывается, достигая значительных конформационных изменений в своей изоэлектрической точке рI 4,9.

На рисунке 3.2 представлены спектры флуоресценции BSA без примесей и с добавлением NP металлов. Можно отметить, что при связи с частицами металлов наблюдается явление тушения флуоресценции. При образовании комплексов BR+BSA наблюдается смещение пика флуоресценции белка в красную область, для комплексов BSA+SNP и BSA+GNP сдвиг максимума спектра флуоресценции растворов бычьего сывороточного альбумина, содержащих наночастицы металлов, сдвиг происходит в коротковолновую область, т.е. можно наблюдать смещение пика в синюю область.

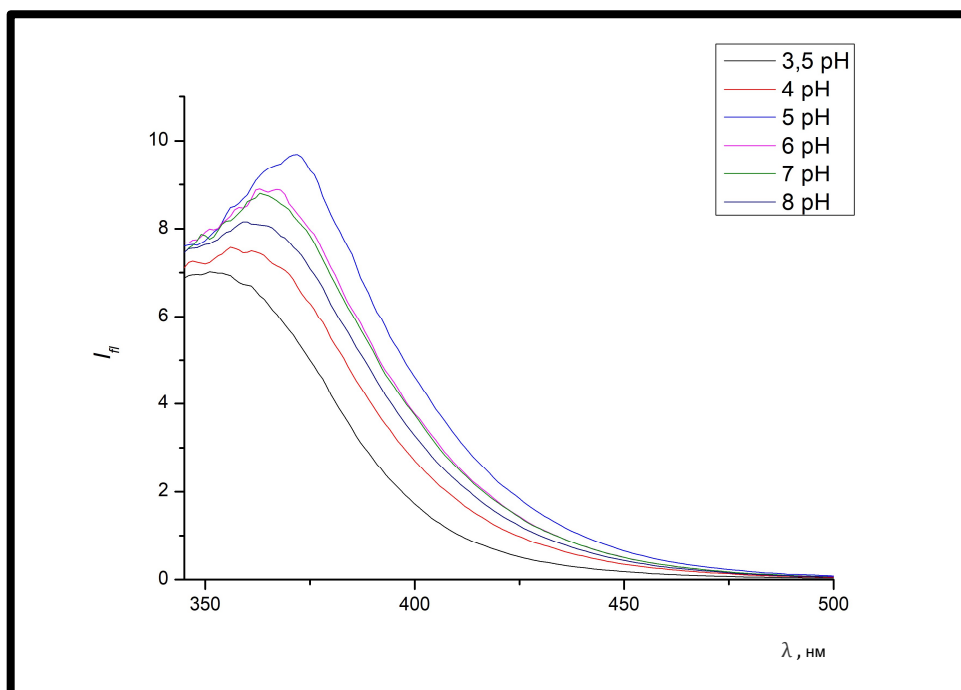


Рис.3.1 Спектры флуоресценции BSA (50 мкМ) при различных рН

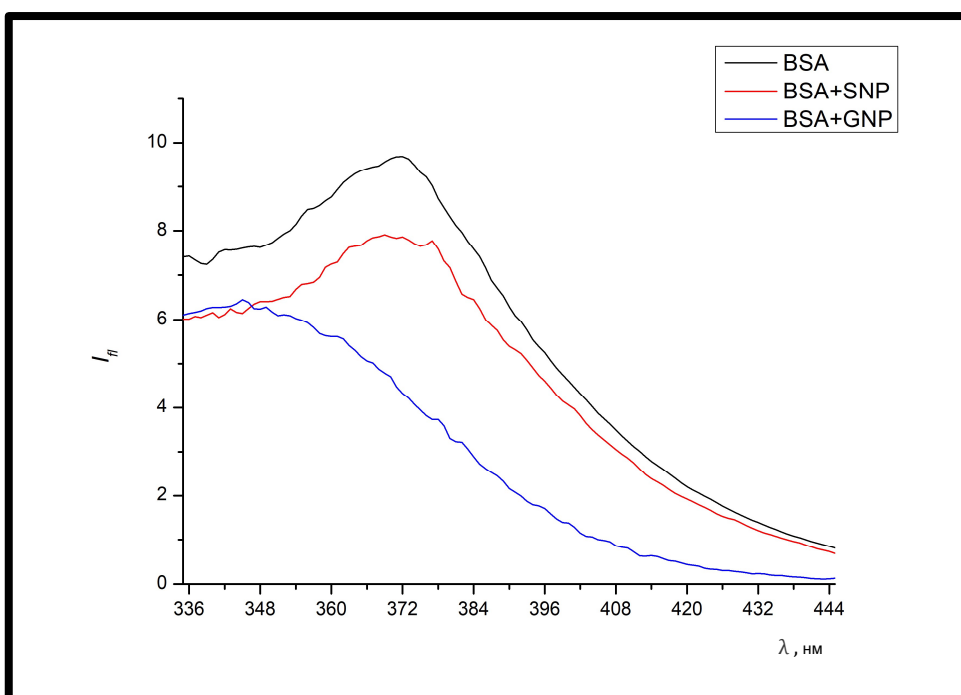


Рис. 3.2 Спектры флуоресценции BSA без примесей и с наночастицами серебра и золота при рН равном 5,0

В ходе исследования спектров флуоресценции BSA было отмечено, что при изменении рН происходит смещение значений длины волны максимума интенсивности флуоресценции белка ($\lambda_{fl_{max}}$). Так, например, при одинаковых концентрациях BSA, равной, 25 мкМ в буфере при рН равном 3,5 максимум флуоресценции достигается на 331 нм, в то время как при рН равном 5,0 - на

364 нм. Стоит отметить, что зависимость значения длины волны максимума интенсивности флуоресценции белка ($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$) от pH раствора имеет нелинейный вид с максимумом при pH 5,0 (рис. 3.3(а)). Аналогичная картина наблюдается и для значения максимума интенсивности флуоресценции ($I_{\text{max}}^{\text{fl}}$) BSA от pH (рис. 3.3(б)). Данное явление обусловлено тем, что pH 5,0 находится вблизи изоэлектрической точки BSA. При прохождении pH 4,9 заряд белка меняется на отрицательный, и его пространственная структура изменяется.

В процессе работы были получены и проанализированы значения ($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$) в зависимости от концентрации BSA, BR, SNP, GNP и pH раствора. Смещение пика происходило при добавлении примесей в раствор BSA. В системах «GNP+BSA» наблюдалось смещение пика флуоресценции в синюю область. Максимум смещения для неё был достигнут при pH равном 5,0, аналогичная зависимость наблюдалась для комплексов «белок+SNP» и для комплексов бычий сывороточный альбумин с BR.

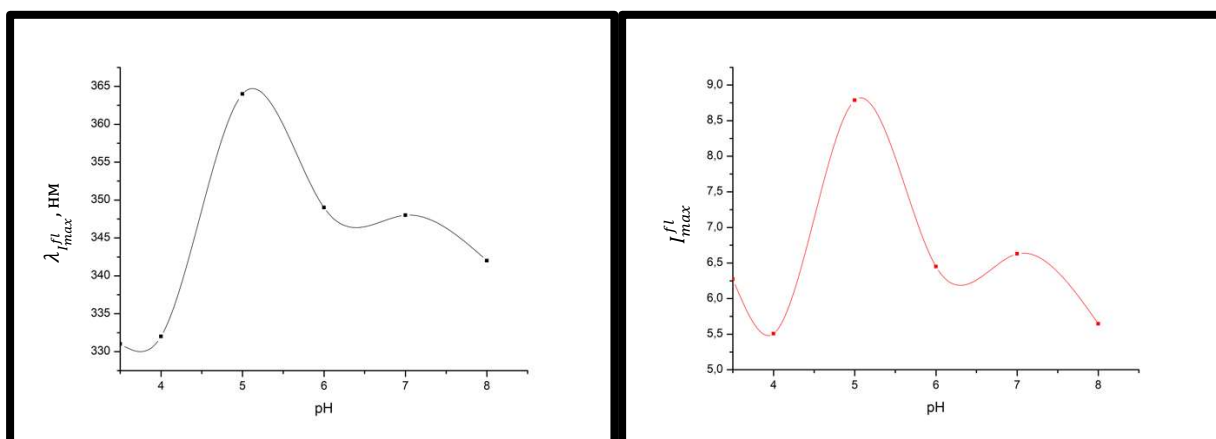


Рис. 3.3 График зависимости $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ (а) и значения пика $I_{\text{max}}^{\text{fl}}$ (б) флуоресценции BSA в зависимости от pH среды.

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

Табл.1 Значения $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ спектров флуоресценции BSA при изменении pH (3,5-8,0) и концентрации BSA (25 мкМ, 50 мкМ и 75 мкМ).

При проведении экспериментов были созданы сложные комплексы, состоящие из BSA, SNP (или GNP) и присоединенных к молекулам белка флуоресцентных зондов BR. Анализ параметров $\lambda_{I_{max}}^{fl}$ и I_{max}^{fl} проводился при варьировании концентраций всех компонент систем “BSA+SNP+BR” и “BSA+GNP+BR” при $3,5 < pH < 8,0$. Пример полученной зависимости $\lambda_{I_{max}}^{fl}$ от pH представлен на рис.3.4. Сопоставление полученных данных, показало, что зависимости $\lambda_{I_{max}}^{fl}(pH)$ и $I_{max}^{fl}(pH)$ имеют нелинейный характер.

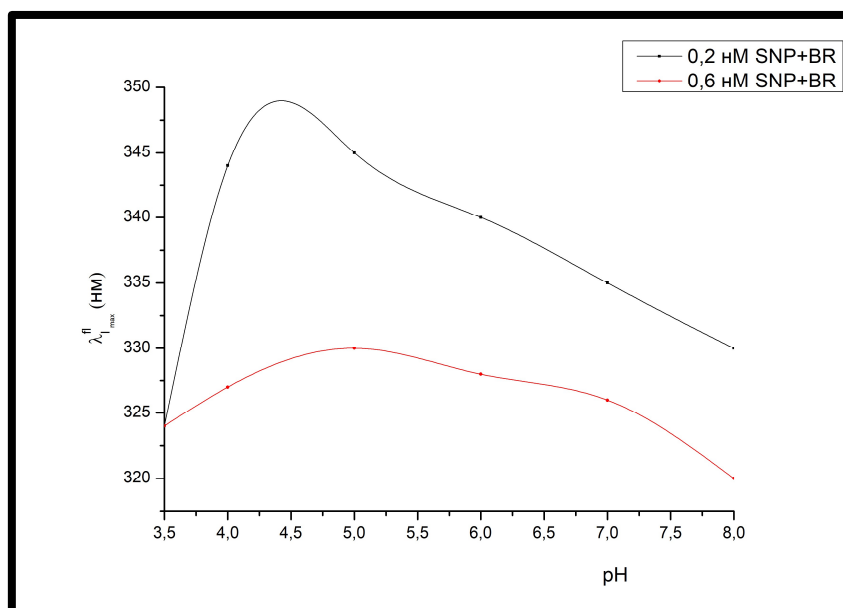


Рис. 3.4 График смещения пиков флуоресценции в зависимости от pH среды

В данной работе были рассчитаны, при помощи метода Штерна – Фольмера, коэффициенты тушения флуоресценции в зависимости от концентрации наночастиц металлов для систем “BSA+SNP” и “BSA+ GNP”. В качестве примера на рис 3.5 приведена зависимость коэффициента тушения (K_{eff}) флуоресценции белка от концентрации частиц SNP (C_{SNP}) для двух разных концентраций белка, при росте C_{SNP} тушение усиливается. Аналогичные зависимости наблюдаются и для системы “BSA+ GNP”.

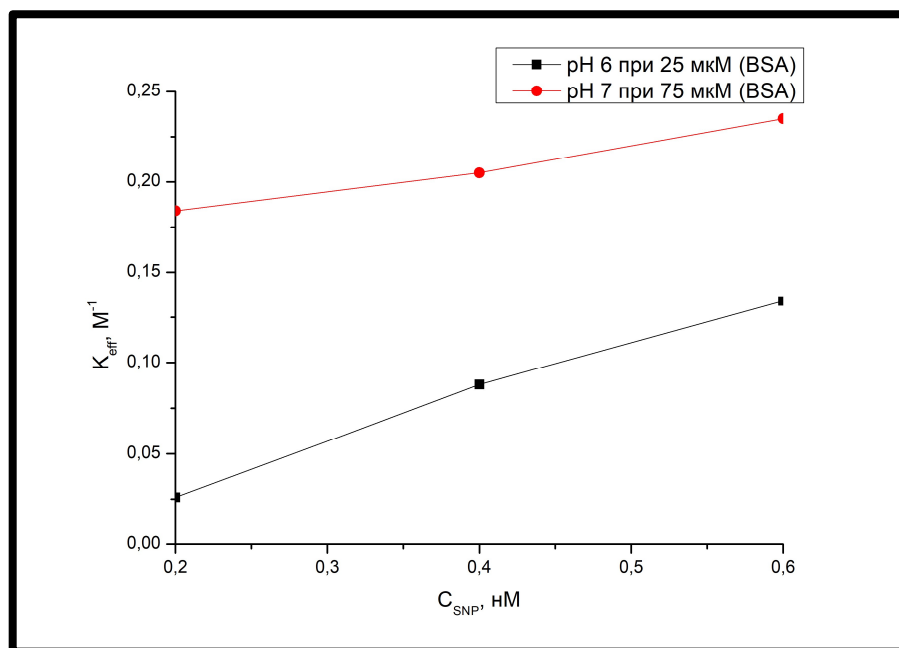


Рис. 3.5 График зависимости коэффициента тушения от концентрации частиц серебра

При проведении анализа полученных графиков было выяснено, что коэффициенты тушения достигают своего максимума при тушении наночастицами серебра при pH 5,0 (рис. 3.6). При тушении белка наночастицами золота наблюдается схожая картина (рис. 3.7). Максимум коэффициента тушения также достигается при pH 5,0.

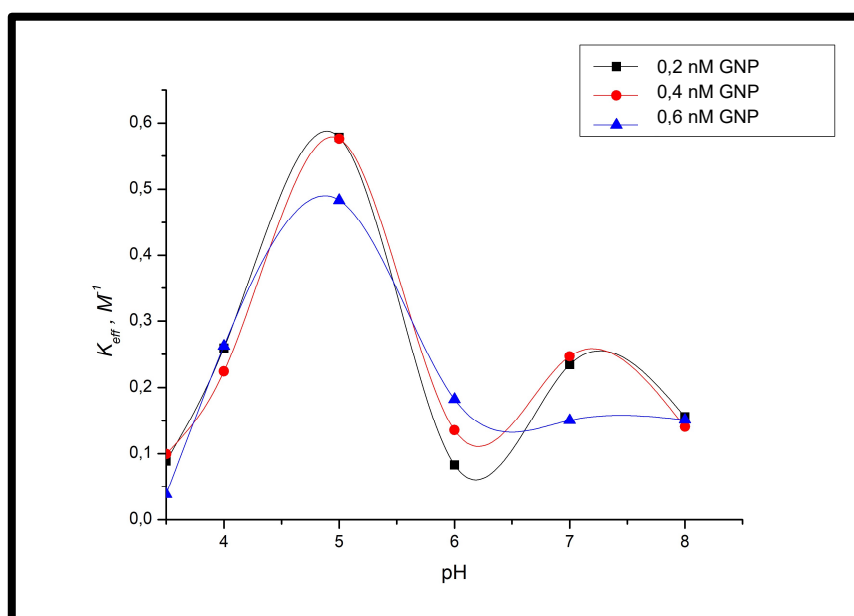


Рис.3.6 График зависимости коэффициента тушения BSA от pH, при различных концентрациях наночастиц серебра.

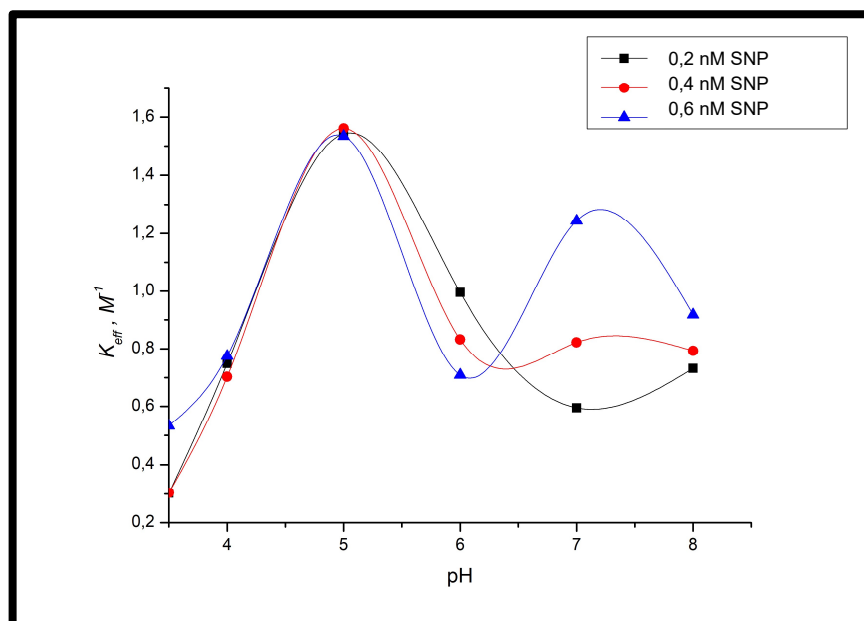


Рис.3.7 График зависимости коэффициента тушения BSA от pH, при различных концентрациях наночастиц золота.

3.2 Определение характеристик поляризованной люминесценции красителя семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина с наночастицами металлов

В данном параграфе проводится анализ спектров поляризованной флуоресценции. В качестве примеров представлены графики спектров поляризованной флуоресценции BSA без тушителей ($I_{fl}(\lambda)$) (Рис. 3.8(a)), BSA с BR (Рис. 3.8(б)), BSA, наночастицами золота (Рис. 3.9(a)) и BSA с наночастицами золота и BR (Рис.3.9(б)).

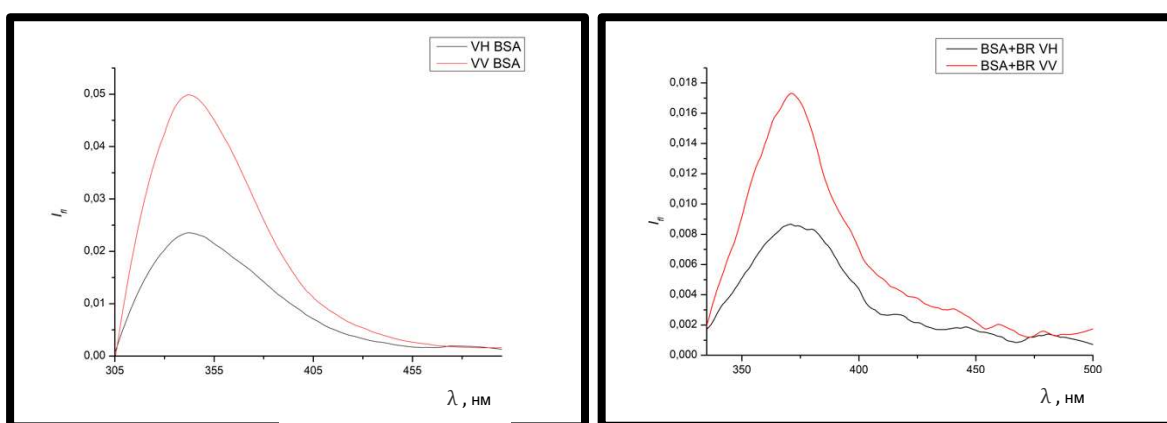


Рис. 3.8 Спектры поляризованной флуоресценции BSA без примесей при pH равном 5(а), спектры поляризованной флуоресценции BSA с бенгальским розовым при pH равном 5(б)

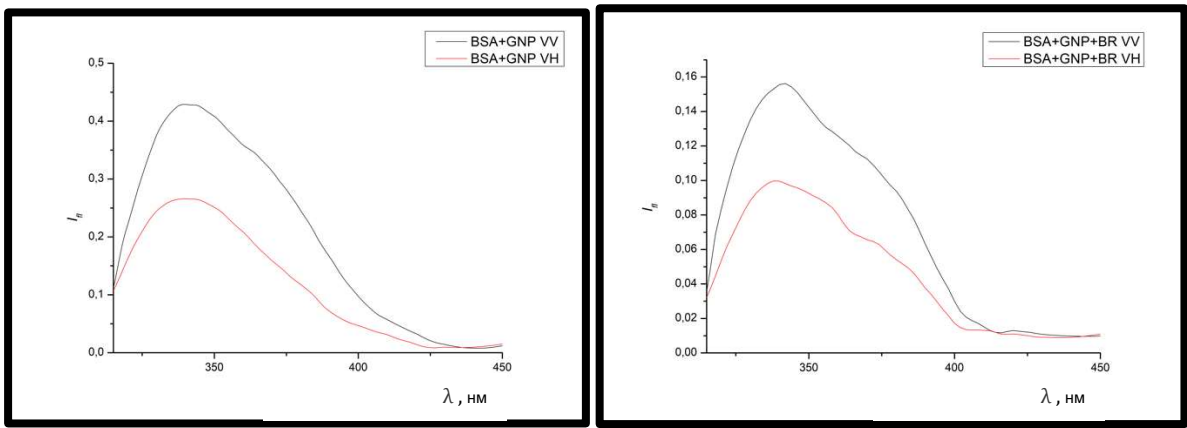


Рис.3.9 Спектры поляризованной флуоресценции BSA с наночастицами золота при pH 5,0 (а), спектры поляризованной флуоресценции BSA с наночастицами золота и бенгальского розового) при pH 5,0 (б)

Поскольку BSA, как большинство биологических веществ, анизотропен, то мы можем рассчитать его степени поляризации и анизотропии без примесей и при сочетании с частицами золота, серебра и красителя. В качестве примера приведен графики зависимости степени поляризации и анизотропии от pH раствора, при добавлении в раствор BSA наночастиц серебра, золота или БР (Рис 3.10). Было отмечено, что при добавлении наночастиц серебра в раствор степени поляризации и анизотропии изменяются незначительно. В случае взаимодействия золота и BSA нетрудно заметить, что зависимость степеней поляризации и анизотропии от pH среды принимает S-образный вид.

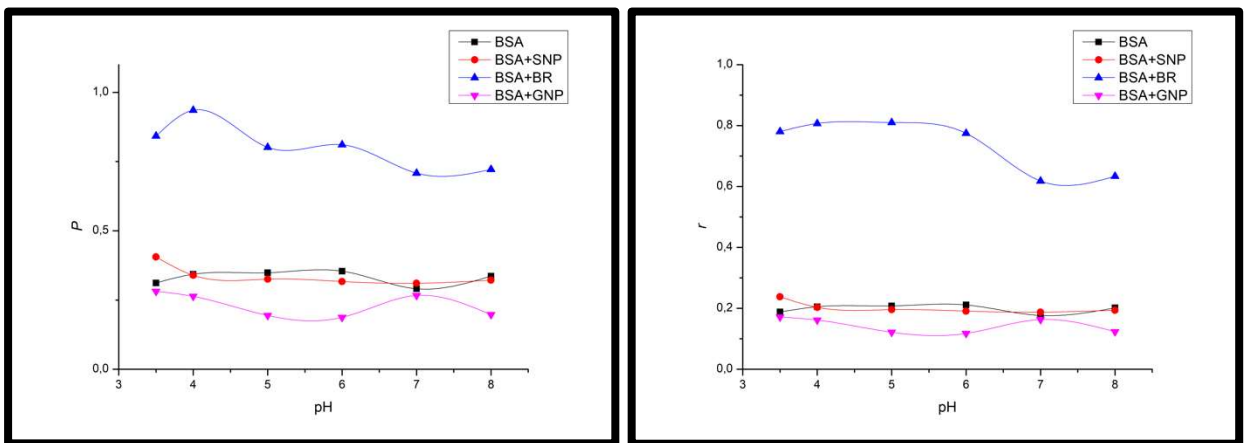


Рис. 3.10 График зависимости степени поляризации(а)и анизотропии(б) BSA в зависимости от pH среды с наночастицами серебра и золота и БР

3.3 Анализ спектров поглощения исследуемых растворов при различных значениях pH

В данном параграфе приведено рассмотрение спектров поглощения BSA как с наночастицами серебра, золота и красителя, так и без них. В качестве примера приведен спектр (Рис.3.11) поглощения BSA без примесей, и с наночастицами металлов (SNP, GNP), на котором видно, что поглощение раствора с примесями наночастиц металлов выше, чем у раствора белка без примесей. Также из спектра белка с примесями наночастиц золота, по его виду, можно сразу сказать, что при одинаковых концентрациях золота и серебра, золото значительно сильнее влияет на коэффициент поглощения. Данное явление связано с тем, что при взаимодействии BSA с SNP и GNP, образуется белковая корона вокруг молекул металлов. Что приводит к увеличению коэффициентов экстинкции.

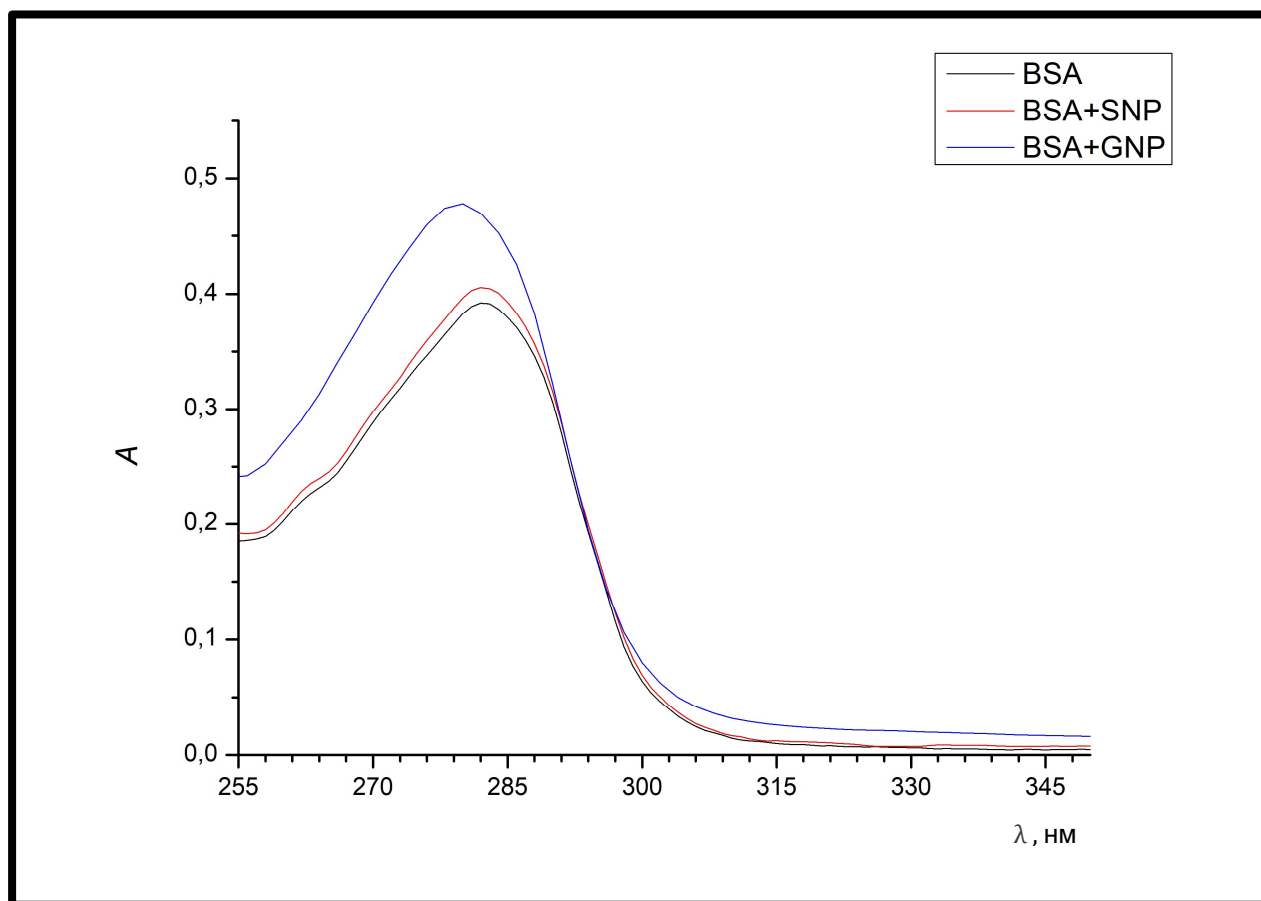


Рис. 3.11 Спектры поглощения BSA с наночастицами металлов и без них.

Также с помощью метода Бенези – Хильдебранда, были рассчитаны константы ассоциации K_{app} наночастиц металлов с BSA, при разных концентрациях белка в различных рН (см. приложение табл. 1, 2). Под

константой ассоциации (K_{app}) в данном случае понимается физико-химическая величина, характеризующая, то насколько хорошо связываются два элемента без изменения их химических свойств. При сравнении значений констант ассоциации из таблиц 2 и 3, полученных в ходе расчётов, видно, что коэффициенты связывания для белка с SNP и для белка с GNP отличны. Данный факт нужно учитывать при проведении биофизических, медицинских и фармацевтических исследований. Причем максимума данная величина достигает при pH 5,0, поскольку при данном значении молекулы белка нейтральны, а электроотрицательность золота выше, чем у серебра, что означает, что связывание будет происходить лучше у тех наночастиц металлов, которые обладают меньшей электроотрицательностью. Кроме того, константа ассоциации растет пропорционально увеличению концентрации белка, поскольку появляется больше свободных молекул BSA готовых к присоединению лиганда (см. приложение табл. 1). Также можно отметить общее падение значения констант ассоциации после прохождения изоэлектрической точки BSA, поскольку при $pH > 4,9$ белок приобретает отрицательный заряд и хуже связывается с отрицательно заряженными NP металлов.

pH	Концентрация BSA	$K_{app}, 10^9 M^{-1}$
3,5	50 мкМ	0,469
4	50 мкМ	0,427
5	50 мкМ	1,091
6	50 мкМ	0,913
7	50 мкМ	0,419
8	50 мкМ	0,186

Табл.2 Таблица K_{app} для серебра в зависимости от концентрации BSA и pH системы

pH	Концентрация BSA	$K_{app}, 10^9 M^{-1}$
3,5	50 мкМ	0,638
4	50 мкМ	0,019
5	50 мкМ	0,036
6	50 мкМ	0,018
7	50 мкМ	0,015
8	50 мкМ	0,034

Табл.3 Таблица K_{app} для золота в зависимости от концентрации BSA и pH системы

3.4 Определение размеров частиц золота и серебра в буферных растворах и в растворах, содержащих бычий сывороточный альбумин и флуоресцентный маркер

Не менее важным аспектом исследования взаимодействия BSA с наночастицами металлов и красителей являются размеры получаемых систем. Связано это с изменением пространственной структуры белка в зависимости от внешних факторов. Так при помощи методов корреляционной спектроскопии было выяснено, что рН среды незначительно влияет на диаметр молекул исследуемых металлов при равных концентрациях без примесей белка и красителя. Был проведен анализ результатов, представленных в приложении в таблице 2. рН не оказывает значительного влияния на размеры образующихся комплексов. При взаимодействии наночастиц серебра с BSA (см. приложение табл. 3) образующиеся комплексы достигают своего максимального значения порядка 170 \AA при рН равном 5,0. Комплексы, состоящие из белка и наночастиц золота, достигают своего максимального значения при том же рН среды, но образуют несколько большие, порядка 180 \AA , системы (см. приложение табл. 4). Отличие между системами BSA+SNP и BSA+GNP связано с тем, что первоначальный размер образцов серебра и золота отличался на 1 нм (SNP 11 нм, GNP 12 нм). Расположение максимумов гидродинамического диаметра образующихся систем не случайно, оно связано с изменением пространственной структуры белка. Раскрываясь, BSA достигает своих максимальных размеров порядка 47 \AA при рН 5,0. При достижении изоэлектрической точки белковая корона, образующаяся вокруг NP металлов и красителя, достигает своих максимальных размеров, что влечет за собой общее увеличение размеров всей структуры. В системах, в которых взаимодействовали наночастицы металлов, BSA и БР (см. приложение табл. 5, б) замечено общее увеличение размера образующихся комплексов на $10\text{-}20 \text{ \AA}$, что говорит о том, что БР также принимает участие в процессе связывания с BSA и наночастицами золота и серебра. На основе всех полученных данных, можно сделать вывод, что на гидродинамический радиус систем с участием

BSA напрямую влияет состав раствора и добавляемых в него элементов, а также pH среды.

3.5 Исследования синхронных спектров флуоресценции растворов сывороточного альбумина с наночастицами металлов

В данном параграфе приводится анализ синхронных спектров флуоресценции сдвиг между волнами флуоресценции и возбуждения флуоресценции был подобран таким образом, чтобы по получившимся спектрам можно было получить информацию об остатках Тирозина(Tyr) и Триптофана(Trp) в BSA. В качестве примеров представлены синхронные спектры с BSA без примесей (рис. 3.12(а) и рис. 3.12(б)), с BSA с наночастицами серебра (рис. 3.13(а)) и с BSA и БР (рис. 3.13(б)).

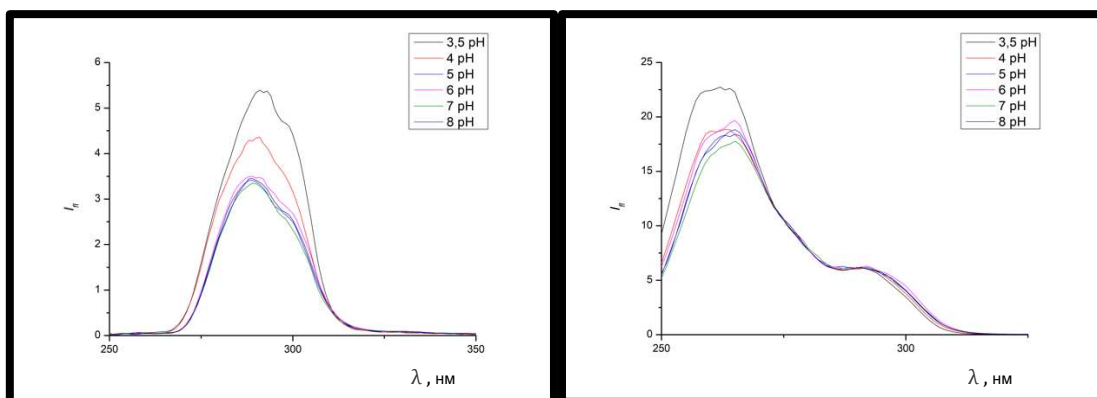


Рис. 3.12 Синхронные спектры флуоресценции BSA при различных pH и $\Delta\lambda=15$ нм(а) $\Delta\lambda=60$ нм(б)

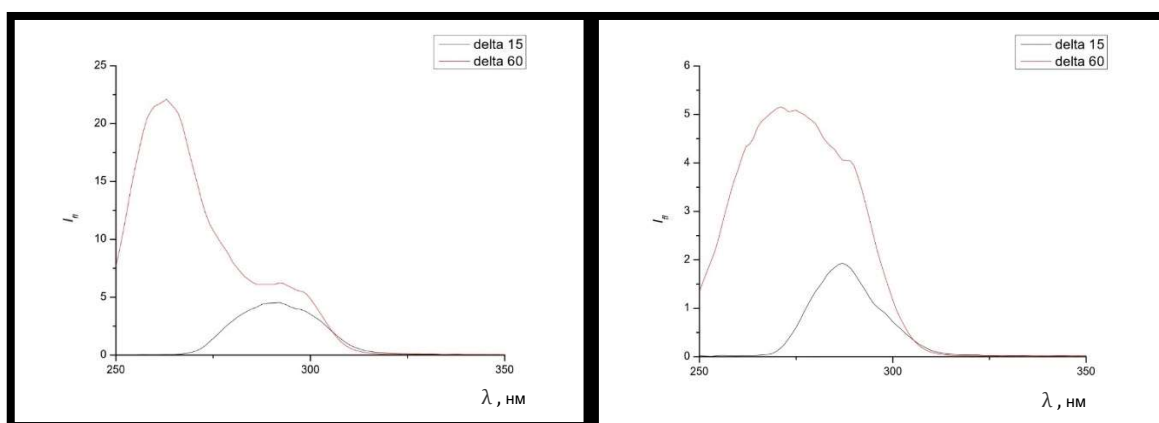


Рис. 3.13 Синхронные спектры флуоресценции BSA наночастицами серебра (а) с бенгальским розовым (б) при pH равным 6,0

В комплексе «BSA + SNP» при сдвиге волн в 15 нм наблюдается смещение пика флуоресценции в синюю область (рис. 3.14(а)), что говорит о том, что в процессе взаимодействия наночастиц серебра и BSA, участвуют

остатки Тирозина в третичной структуре белка. При $\Delta\lambda=60$ нм (рис. 3.14(б)) смещения не наблюдается, что говорит о том, что Триптофан не участвует в формировании домена «BSA + SNP».

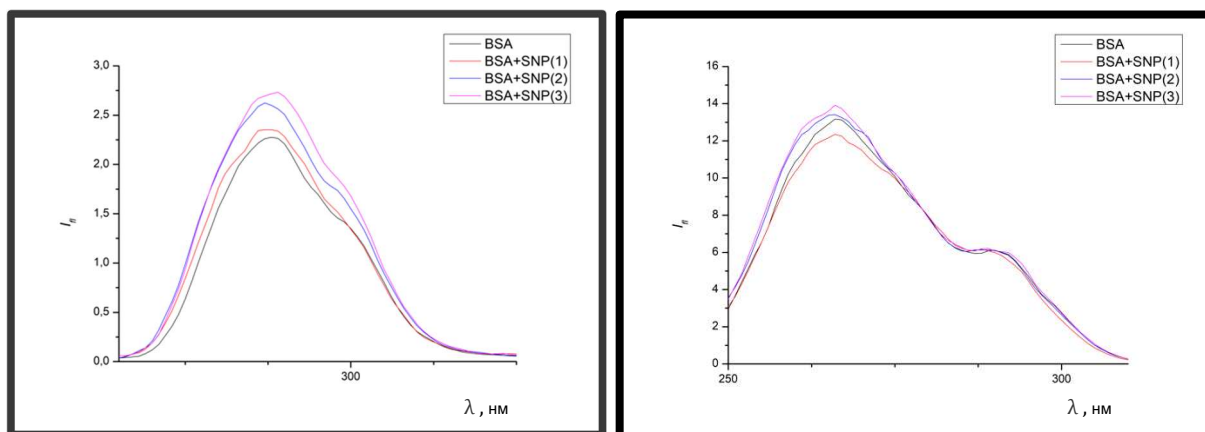


Рис. 3.14 Синхронные спектры флуоресценции BSA без примесей, так и с наночастицами серебра различных концентраций при pH равным 5 при $\Delta\lambda=15$ нм(а) и $\Delta\lambda=60$ нм(б).

При взаимодействии GNP и BSA можно наблюдать диаметрально от системы «SNP+BSA» картину: при сдвиге равном 15 нм(3.15(а)), смещение мало, порядка нескольких нм, т.е. нельзя пренебрегать общим разнообразием микросреды для аминокислотных остатков Тур. При длине волны смещения равном 60 нм(3.15(б)) наблюдается сдвиг пиков в красную область. Это означает, что происходят конформационные изменения в BSA и полярность вокруг Тгр возрастает, это является следствием того, что Тгр помещен в более гидрофильную среду.

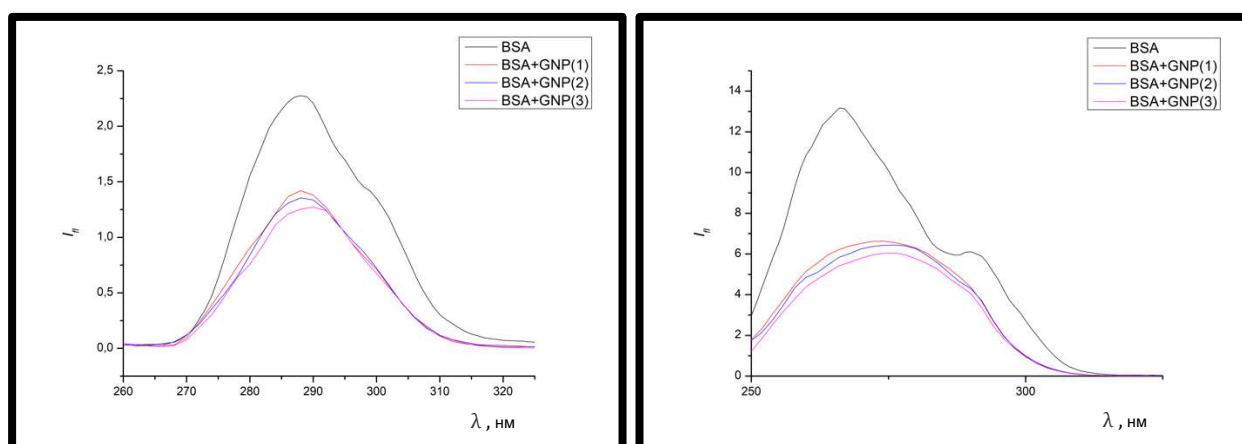


Рис. 3.15 Синхронные спектры флуоресценции BSA без примесей, так и с наночастицами золота различных концентраций при pH равным 7 при $\Delta\lambda=15$ нм(а) и $\Delta\lambda=60$ нм(б)

При взаимодействии BR и BSA при $\Delta\lambda=15$ нм (3.16(а)), также как и при

взаимодействии белка и золота, смещение отсутствует, в то время как при $\Delta\lambda=60$ нм (3.16(б)) наблюдается смещение в красную область, что, в свою очередь, говорит о том, что основную роль при взаимодействии BR и BSA играет Триптофан.

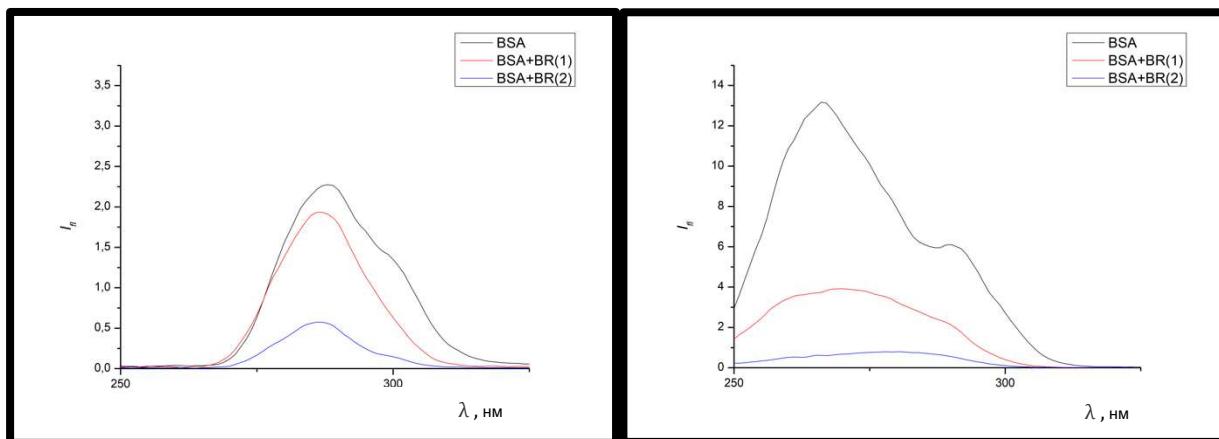


Рис. 3.16 Синхронные спектры флуоресценции BSA без примесей, так и BR различных концентраций при pH равным 7,0 при $\Delta\lambda=15$ нм (а), $\Delta\lambda=60$ нм (б)

Анализ синхронных спектров всех трех систем («SNP+BSA»; «GNP+BSA» и «BR+BSA») говорит о том, что происходят изменения в структуре исследуемого сывороточного альбумина по сравнению с его нативным состоянием при взаимодействии с частицами металлов или флуоресцентного маркера.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методом флуоресцентной спектроскопии был проведен анализ растворов BSA с наночастицами серебра, золота, флуоресцентного маркера и без примесей при различных значениях pH (от 3,5 до 8,0). Наблюдалось смещение пика флуоресценции при варьировании кислотности среды (при изменении pH).

2. Были рассчитаны коэффициенты тушения флуоресценции при добавлении в раствор наночастиц металлов или молекул флуоресцентного красителя и рассмотрены изменения этой величины в зависимости от pH и заряда белка.

3. Методом поляризованной флуоресценции были рассчитаны степень поляризации и анизотропии и показано, что при добавлении в раствор белка наночастиц серебра или BR значения параметров P и r изменяются незначительно.

4. Для анализа пространственного изменения комплекса белок+ наночастица (красителя или металла) были рассчитаны как размеры каждого исследуемого объекта в отдельности (BSA, SNP, GNP, BR), так и их комплексов.

5. Было показано, что зависимость λ_{max}^{fl} спектра флуоресценции BSA и ее интенсивности в максимуме спектра I_{max} от pH 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 позволили наблюдать уменьшение отношения T_{tr} и T_{ug} при исследуемых pH.

7. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что при добавлении в растворы BSA наночастиц металлов наблюдается тушение флуоресценции BSA.

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 BSA 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 Juraˇsin , Marija Curlin ´, Goran Sinko , Tin Weitner, Ivana Vinkovi´ Vrˇcek, 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 BSA 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
50. Radek Ostruszka, Giorgio Zoppellaro and Ondřej Tomanec Evidence of Au(II) and Au(0) States in Bovine Serum Albumin-Au Nanoclusters Revealed by CW-EPR/LEPR and Peculiarities in HR-TEM/STEM Imaging // *Nanomaterials*, 2022, 12(9), 1425
51. Archana P. Retnakumari, Sonali Setua and Deepthy Menon Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging // *Nanotechnology*, 2009, 21(5)
52. Ankita Chaudhary, Chetan B., Sangani and R.K. Ameta Spectrophotometric and physicochemical investigations of Congo, alizarin red dyes and BSA interactions with Au, Ag and Au/Ag mix nanoparticles, and their antimicrobial activities // *Journal of the Indian Chemical Society*, 2022, 99(11)
53. Gongke Wanga, Changling Yana, Shuyan Gaoa and Yufang Liub Surface chemistry of gold nanoparticles determines interactions with bovine serum albumin // *Materials Science and Engineering: C*, 2019, Volume 103
54. Sergio Dominguez-Medina, Steven McDonough, Pattanawit Swanglap, Christy F. Landes and Stephan Link In Situ Measurement of Bovine Serum Albumin Interaction with Gold Nanospheres // *Langmuir* 2012, 28, 24, 9131–9139

55. Marijana P.Kasalović, Angelina Petrović and Jelena M.Živković Evaluation of DNA/BSA interactions and DFT calculations of gold(III), zinc(II) and palladium(II) complexes with triammonium N-dithiocarboxyiminodiacetate // *Journal of Molecular Structure*, 2021, Volume 1229
56. Hua-Li Yue, Yan-Jun Hu, Hong-Gui Huang, Shan Jiang and Bao Tu Development of morin-conjugated Au nanoparticles: Exploring the interaction efficiency with BSA using spectroscopic methods // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, Volume 130, Pages 402-410
57. Zheng-Fen Pu, Jun Peng, Qiu-Lin Wen and Yu Li Photocatalytic synthesis of BSA-Au nanoclusters with tunable fluorescence for highly selective detection of silver ion // *Dyes and Pigments*, 2021, Volume 193
58. Chengzhi Zheng, Huiping Wang and Wei Xu Study on the interaction between histidine-capped Au nanoclusters and bovine serum albumin with spectroscopic techniques // *Journal of Molecular Structure*, 2021, Volume 1227
59. Aswathy Ravindran, Anupam Singh and Ashok M.Raichur Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA) // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, Volume 76, Issue 1, Pages 32-37
60. Cristian R.Lillo, M. Natalia Calienni, Belen Rivas Aiello and M. Jimena Prieto BSA-capped gold nanoclusters as potential theragnostic for skin diseases: Photoactivation, skin penetration, in vitro, and in vivo toxicity // *Materials Science and Engineering: C*, 2020, Volume 112
61. Swarup Roy and Tapan Kumar Das Interaction of biosynthesized gold nanoparticles with BSA and CTDNA: A multi-spectroscopic approach // *Polyhedron*, 2015, Volume 115, Pages 111-118
62. Jing Lin, Zhijun Zhou and Chunlei Zhang Biomimetic one-pot synthesis of gold nanoclusters/nanoparticles for targeted tumor cellular dual-modality imaging // *Nanoscale Research Letters*, 2013, 8(1):170
63. Pengyang Wang, Xin Wang, Liming Wang, Xiaoyang Hou, Wei Liu and Chunying Chen Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells // *Science and Technology of Advanced Materials*, 2015, Volume 16, Issue 3

64. Varsha P. Brahmkhatri, Amrinder Singh, Arpan Chakraborty and R Shankararama Sharma Multilayer protein corona on gold nanorod surface: First evidence of soft corona protein-protein interactions using solution NMR spectroscopy // *Applied Surface Science Advances*, 2011, Volume 11
65. Aparna Jyothi Kumar, M. Kailasnath, Jessy Simon and S. Mathew BSA Stabilized Gold Nanoparticles: Synthesis and Characterization // *Materials Today: Proceedings*, 2019, Volume 9, Part 1, Pages 111-115
66. Yimeng Geng, Sizhe Zhang, Yuxian Wang, Nengsheng Ye and Yuhong Xiang Aptamer act as fluorescence switching of bovine serum albumin stabilized gold nanoclusters for ultrasensitive detection of kanamycin in milk // *Microchemical Journal*, 2021, Volume 165
67. Vidhi Jain, Stuti Bhagat and Sanjay Singh Bovine serum albumin decorated gold nanoclusters: A fluorescence-based nanoprobe for detection of intracellular hydrogen peroxide // *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, Volume 327
68. Liping Zhang, Min Zhang and Yuqing Wu Temperature-induced optical property and conformational change of BSA-protected gold nanoclusters // *Journal of Molecular Structure*, 2014, Volume 1069, Pages 245-250
69. Bence Fehér, Jeppe Lyngsø, Boróka Bartók, Judith Mihály and Zoltán Varga Effect of pH on the conformation of bovine serum albumin - gold bioconjugates // *Journal of Molecular Liquids*, 2020, Volume 309
70. Yuan Yu, Hong-Wei Li, Tian-Ying Liu and Yuqing Wu Exploring the role of ligand-BSA in the response of BSA-protected gold-nanoclusters to silver (I) Ions by FT-IR and circular dichroism spectra // *Vibrational Spectroscopy*, 2014, Volume 74, Pages 137-141
71. Yaxin Niu, Tong Ding, Junmin Liu, Guanglu Zhang, Lili Tong and Xiufen Cheng Fluorescence switch of gold nanoclusters stabilized with bovine serum albumin for efficient and sensitive detection of cysteine and copper ion in mice with Alzheimer's disease // *Talanta*, 2021, Volume 223, Part 2
72. Mara Grube, Karlis Shvirksts, Dominyka Dapkute, Marija Matulionyte and Elina Zandberga FT-IR spectroscopy studies of the breast cancer cell

- composition changes induced by Au-BSA nanoclusters // Journal of Biotechnology, 2016, Volume 231, Supplement, Page S93
73. Li Liu, Hu-Zhi Zheng, Zhu-Jun Zhang and Yu-Ming Huang Photoluminescence from water-soluble BSA-protected gold nanoparticles // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2008, Volume 69, Issue 3, Pages 701-705
74. Aparna JyothiKumar, M. Kailasnath, Jessy Simon, S.Mathew BSA Stabilized Gold Nanoparticles: Synthesis and Characterization // ScienceDirect Materials Today, 2019, Proceedings 9, 111–115
- 75.75. Li Liu, Hu-Zhi Zheng , Zhu-Jun Zhang, Yu-Ming Huang, Su-Ming Chen and Yu-Fei Hu Photoluminescence from water-soluble BSA-protected gold nanoparticles // ScienceDirect, 2008, Spectrochimica Acta, Part A 69, 701–705
76. E. Achilli, C.Y. Flores, C.F. Temprana, S. del V. Alonso, M. Radrizzani and M. Grasselli Enhanced gold nanoparticle-tumor cell recognition by albumin multilayer coating // OpenNano
77. Kuo-Hao Lee, Sheng-Feng Lai, Yan-Cheng Lin, Wu-Ching Chou, Edwin B.L. Ong, Hui-Ru Tan, Eng Soon Tok, C.S. Yang, G. Margaritondo and Y. Hwu Gold nanoparticles: BSA (Bovine Serum Albumin) coating and X-ray irradiation produce variable-spectrum photoluminescence // Materials Chemistry and Physics
78. SHI XiuJuan, LI Dan, XIE Jing, WANG Shawn, WU ZhaoQiang and CHEN Hong Spectroscopic investigation of the interactions between gold nanoparticles and bovine serum albumin // Chinese Science Bulletin, 2012, Vol.57, No.10
79. Husain Alsamamra, Ibrahim Hawwarin, Sawsan Abu-Sharkh and Musa Abuteir Study the Interaction between Gold Nanoparticles and Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Approach // Journal of Bioanalysis and Biomedicine, 2018, 10(2)
80. Xue-Ling Cao, Hong-Wei Li, Yuan Yue and Yuqing Wua pH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission // Vibrational Spectroscopy, 2013, Volume 65, Pages 186-192
81. Selma M.H. AL-Jawad, Ali A. Taha, Mohammad M.F. Al-Halbosiyy and Lamyaa

- F.A. AL-Barram Synthesis and characterization of small-sized gold nanoparticles coated by bovine serum albumin (BSA) for cancer photothermal therapy // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2018, Volume 21, Pages 201-210
82. Rong Wu, Huaping Peng, Jun-Jie Zhu, Li-Ping Jiang and Juewen Liu Attaching DNA to Gold Nanoparticles With a Protein Corona // *Front. Chem.*, 2020, Sec. Nanoscience, Volume 8
83. Ditta Ungor , 'Ad'am Juh'asz, Norbert Varga and Edit Csap'o Evaluation of noble metal nanostructure-serum albumin interactions in 2D and 3D systems: Thermodynamics and possible mechanisms // *Advances in Colloid and Interface Science*, 2021, Volume 301

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ

Давыдов Ф.Д., Кулешова А.А., Салецкий А.М. ВЛИЯНИЕ pH НА СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ “МЯГКОЙ” БЕЛКОВОЙ КОРОНЫ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА // Журнал прикладной спектроскопии, издательство Наука и техника (Минск), том 89, № 2, с. 230-237, 2022

ПРИЛОЖЕНИЕ

рН	Концентрация BSA	$K_{app}, 10^9 M^{-1}$ (SNP)	$K_{app}, 10^9 M^{-1}$ (GNP)
3,5	25 мкМ	0,627	0,577
3,5	50 мкМ	0,469	0,638
3,5	75 мкМ	1,173	0,641
4	25 мкМ	0,242	0,021
4	50 мкМ	0,427	0,019
4	75 мкМ	0,952	0,011
5	25 мкМ	0,255	0,006
5	50 мкМ	1,091	0,036
5	75 мкМ	1,519	0,049
6	25 мкМ	0,091	0,016
6	50 мкМ	0,713	0,018
6	75 мкМ	0,899	0,022
7	25 мкМ	0,315	0,017
7	50 мкМ	0,419	0,015
7	75 мкМ	0,459	0,017
8	25 мкМ	0,130	0,034
8	50 мкМ	0,186	0,034
8	75 мкМ	0,164	0,042

Табл. 7 Таблица K_{app} для серебра и золота в зависимости от концентрации BSA и рН системы

рН	SNP/GNP	Диаметр без примесей SNP, Å	Диаметр без примесей GNP, Å
3,5	0,2 nM	93,51	106,59
3,5	0,4 nM	121,64	138,66
3,5	0,6 nM	127,35	145,12
4,0	0,2 nM	95,37	94,41
4,0	0,4 nM	126,07	124,81
4,0	0,6 nM	129,84	128,54
5,0	0,2 nM	114,7	113,55
5,0	0,4 nM	120,6	119,39
5,0	0,6 nM	135,5	134,14
6,0	0,2 nM	71,79	78,25
6,0	0,4 nM	77,33	84,25
6,0	0,6 nM	115,9	126,33
7,0	0,2 nM	64,35	63,01
7,0	0,4 nM	57,05	55,90
7,0	0,6 nM	67,86	66,50
8,0	0,2 nM	68,86	67,48
8,0	0,4 nM	95,31	93,39

8,0	0,6 nM	110,62	108,38
-----	--------	--------	--------

Табл.2 Таблица размеров наночастиц серебра при изменении их концентраций и pH среды.

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

Табл.3 Таблица размеров наночастиц серебра при изменении их концентраций и изменении концентрации BSA при различных pH среды.

pH	GNP	25 мкМ BSA	50 мкМ BSA	75 мкМ BSA
3,5	0,2 nM	103,5	127,3	200,4
3,5	0,4 nM	71,6	102,7	39,3
3,5	0,6 nM	147,2	112,4	109,0
4,0	0,2 nM	216,4	191,9	111,4
4,0	0,4 nM	161,2	103,3	420,7
4,0	0,6 nM	189,3	72,5	220,1
5,0	0,2 nM	165,0	159,9	92,7
5,0	0,4 nM	123,6	183,6	215,1
5,0	0,6 nM	157,2	163,9	90,0
6,0	0,2 nM	131,8	93,3	78,9
6,0	0,4 nM	116,3	73,5	94,2
6,0	0,6 nM	185,4	268,8	264,3
7,0	0,2 nM	110,0	77,8	77,8
7,0	0,4 nM	112,4	81,5	72,0
7,0	0,6 nM	118,9	76,5	67,6
8,0	0,2 nM	122,5	125,5	110,9
8,0	0,4 nM	102,3	237,6	210,2
8,0	0,6 nM	166,1	71,7	63,4

Табл.4 Таблица размеров наночастиц золота при изменении их концентраций и изменении концентрации BSA при различных pH среды.

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

Табл.5 Таблица размеров наночастиц серебра при изменении их концентраций и изменении концентрации BSA и БР при различных pH среды.

pH	GNP	0,2 нМ GNP \ 3 мкМ BR	0,2 нМ GNP \ 6 мкМ BR	0,4 нМ GNP \ 3 мкМ BR	0,4 нМ GNP \ 6 мкМ BR	0,6 нМ GNP \ 3 мкМ BR	0,6 нМ GNP \ 6 мкМ BR
3,5	0,2 нМ	85,54	87,76	125,61	130,5	100,32	175,49
3,5	0,4 нМ	93,33	90,69	92,78	112,89	85,63	123,37
3,5	0,6 нМ	95,5	63,12	95,34	111,82	72,36	89,65
4	0,2 нМ	69,36	102,73	90,57	90,66	100,01	122,52
4	0,4 нМ	79,41	99,35	90,88	95,63	102,72	100,22
4	0,6 нМ	100,66	99,8	95,69	121,11	99,45	125,64
5	0,2 нМ	126,72	141,39	154,61	141,82	161,33	159,48
5	0,4 нМ	115,42	160,3	158,2	154	189,36	179,55
5	0,6 нМ	129,63	141,22	145,67	130,92	187,15	185,97
6	0,2 нМ	111,19	124,24	118,58	116,75	168,78	165,32
6	0,4 нМ	78,35	72,51	121,54	119,7	128,63	117,96
6	0,6 нМ	87,5	95,37	99,69	121,44	120,1	128,31
7	0,2 нМ	99,18	134,56	155,12	162,33	147,77	187,41
7	0,4 нМ	85,47	75,52	77,9	75,14	71,35	78,52
7	0,6 нМ	77,62	78	80,48	69,17	57,71	89,94
8	0,2 нМ	70,74	65,23	77,37	70	80,87	67,28
8	0,4 нМ	60,52	62,57	87,49	77,87	80,22	78,89
8	0,6 нМ	51,17	64,02	89	88,82	90,57	157,32

Табл.6 Таблица размеров наночастиц золота при изменении их концентраций и изменении концентрации BSA и БР при различных pH среды.