

УСИЛЕНИЕ СОБСТВЕННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БЕЛКА
В НАНОРАЗМЕРНОМ КОМПЛЕКСЕ© 2012 г. Г. К. Чудинова, И. А. Наговицын, А. К. Никитин,
В. В. Курилкин, член-корреспондент РАН В. И. Конов

Поступило 16.11.2011 г.

Разработка новых методов анализа, поиск эффективных маркеров биообъектов являются одними из приоритетных направлений в областях биологии и медицины в последние два десятилетия [1]. Люминофоры, обладающие узкими и интенсивными полосами люминесценции, наиболее эффективно используются как структурные и аналитические зонды, так как обеспечивают наибольшее отношение сигнал/шум. Неорганические люминофоры (НЛ), примененные в данной работе, обладающие интенсивной люминесценцией, представляют собой порошки, не растворимые в воде и органических растворителях [2]. Создание гидрофильных оболочек наночастиц позволяет получать стабильные растворы наночастиц в воде для их использования в биологии и медицине [3]. В настоящей работе впервые получен комплекс НЛ их солюбилизацией в растворе сывороточного альбумина; обнаружено, что при образовании комплекса происходит усиление собственной люминесценции белка.

Белки в водных растворах обладают собственной люминесценцией, при этом главными люминесцирующими группами являются ароматические аминокислотные остатки триптофана, тирозина и фенилаланина. Эти три аминокислоты имеют сильно перекрывающиеся полосы поглощения и люминесценции. В результате люминесцентного резонансного переноса энергии внутри молекулы белка практически вся световая энергия возбуждения переносится на триптофан, который и является основной репортерной группой в белке [4, 5]. Анализ собственной люминесцен-

ции белка — эффективное средство исследования белок-белкового взаимодействия, структурных изменений белков в областях биологии и медицины [6].

Наноразмерные материалы получали под действием ультразвука. Сывороточный альбумин человека (САЧ) и НЛ — ванадат и хлорванадат редкоземельных ионов — $Y_{0.95}Er_{0.05}VO_4$ и $Y_{0.95}Er_{0.05}VO_3Cl$ — образуют комплексы (КС-1 и КС-2 соответственно), компоненты в которых связаны нековалентно. НЛ получали по методикам, изложенным в работе [7]. Навеску $Y_{0.95}Er_{0.05}VO_4$ или $Y_{0.95}Er_{0.05}VO_3Cl$ заливали раствором САЧ с концентрацией 10^{-5} М в 100 мМ NaCl таким образом, чтобы концентрация НЛ при условии его полного растворения составила бы 0.6 мг/мл. Полученную смесь в течение 40 мин обрабатывали ультразвуком на сонификаторе Branson 1510 при комнатной температуре, отфильтровывали (фильтр “синяя лента”). Спектры поглощения контролировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800, спектры люминесценции — на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5300pc (Япония). При измерении спектров люминесценции ширина щелей возбуждения и эмиссии составляла 1.5 и 3 нм соответственно. Для сравнения размеров исходного белка и частиц комплексов НЛ-САЧ были проведены измерения на спектрометре динамического рассеяния Photocor Complex (США).

В спектрах поглощения САЧ, комплексов КС-1 и КС-2 наблюдали максимум при 278 нм. В работе [8] максимум поглощения пентавалентного иона ванадия в 5N NaOH наблюдали при 270 нм. Спектры люминесценции ($\lambda_{ex} = 280$ нм) КС-1 и КС-2 обнаруживают 6- и 5-кратное увеличение сигнала люминесценции ($\lambda_{em} = 336$ нм) по сравнению с люминесценцией белка (рис. 1). Интенсивность люминесценции КС-1 превышает таковую для КС-2 на 12%. Разница в эффектах увеличения интенсивности люминесценции между двумя комплексами происходит, возможно, за счет присутствия атома хлора в одном из НЛ, что согласуется с известным фактом, что ион хлора является тушителем люминесценции [9]. По-видимому, НЛ в комплексе играют роль донора энер-

Центр естественно-научных исследований
Института общей физики им. А.М. Прохорова
Российской Академии наук, Москва
Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова
Российской Академии наук, Москва
Научно-технологический центр
уникального приборостроения
Российской Академии наук, Москва
Российский университет дружбы народов,
Москва

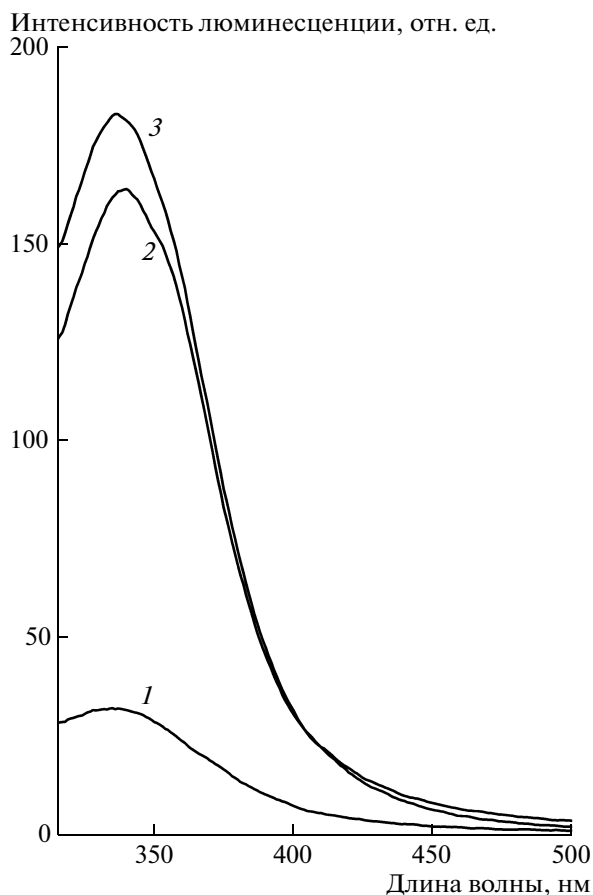


Рис. 1. Спектры люминесценции САЧ и гибридных материалов, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм. 1 – САЧ 10^{-6} М; 2 – КС-2; 3 – КС-1. Растворы КС-1 и КС-2 разбавлены в 10 раз; исходная концентрация САЧ в смеси для образования гибридного материала 10^{-5} М.

гии, а в качестве акцептора выступает аминокислотный остаток триптофана САЧ.

Макромолекула САЧ представляет собой нанобъект размерами $8 \times 8 \times 3$ нм [10]. Для определения размера частиц полученных наноразмерных комплексов были проведены эксперименты на спектрометре динамического рассеяния. Анализ спектров проводили на основании модели, адаптированной для сферических частиц [11], и он показал наличие в растворе САЧ фракции со средним диаметром 6 нм, в растворе гибридного материала КС-1 – 10 нм, КС-2 – 7 нм. По-видимому, окисление хлором [9] соединения $Y_{0.95}Er_{0.05}VO_4$ для получения хлорванадата уменьшает исходные размеры дисперсной фазы. Это может оказывать влияние на количество солюбилизированных частиц. Из-за значительного перекрытия спектров поглощения САЧ и НЛ на данном этапе невозможно определить, какой

именно вклад в интенсивность люминесценции раствора вносит тушение ионами хлора, а какой – размер частиц дисперсной фазы.

Итак, взаимодействие неорганических люминофоров с сывороточным альбумином позволяет в одну стадию получить наноразмерный материал с высокой способностью усиливать собственную флуоресценцию белка. Свойство сывороточного альбумина способствовать проникновению через клеточные мембраны биологически активных веществ и наночастиц [12–14], предполагает перспективность применения полученного материала в качестве клеточного маркера, а, возможно, и биологически активного компонента. Так, известно, что ванадаты, присутствующие в люминофоре, способны имитировать свойства некоторых биологических систем, а также катализировать (ингибировать) отдельные реакции в организме [15].

Коллектив благодарит А.В. Рябову (ЦЕНИ ИОФ РАН) за помощь в работе.

Работа поддержана проектом МНТЦ 3910.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Powe A., Das S., Lowry M., et al. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 4865–4894.
2. DeLuca J. // *J. Chem. Education.* 1980. V. 57. P. 541–545.
3. Сергеев Г.Б. *Нанохимия*. М.: Изд-во МГУ, 2007. 336 с.
4. Пермяков Е. *Метод собственной люминесценции белка*. М.: Наука, 2003. 189 с.
5. Бурштейн Э. Собственная люминесценция белка. *Итоги науки и техники. Биофизика*. М., 1977. Т. 7. 189 с.
6. Strambini G., Gonnelli M. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 196–203.
7. Молодкин А.К., Курилкин В.В., Богатов Ю.Э. и др. // *ЖНХ*. 1982. Т. 27. В. 10. С. 2482–2484.
8. Root C.B. // *Anal. Chem.* 1965. V. 37. № 12. P. 1600–1601.
9. Лакович Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии*. М.: Мир, 1986. 496 с.
10. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., et al. // *Protein Eng.* 1999. V. 12. № 6. P. 439–446.
11. Kaszuba M., McKnight D., Connah M.T., et al. // *J. Nanopart. Res.* 2008. V. 10. P. 823–829.
12. Уайт А., Хендлер Р., Смит Э., Леман И. *Основы биохимии*. М.: Мир, 1981. Т. 3. 726 с.
13. Ferrer M., Duchowicz R., Carrasco B. // *Biophys. J.* 2001. V. 80. P. 2422–2430.
14. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. // *Environ. Health Persp.* 2005. V. 113. P. 823–839.
15. Vanadium Compounds. *Chemistry, Biochemistry, Therapeutic Applications* / A. Tracey, D. Crans. Eds. // *ACS Symp. Ser.* 1998. V. 711. 381 p.