

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 535.37; 532:541.64

ОБРАЗОВАНИЕ ДИПОЛЬНЫХ КЛАСТЕРОВ В РАСТВОРАХ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ КАДМИЯ И КОМПЛЕКСОНЫ ХЕЛАТА ЕВРОПИЯ

Г. П. Петрова, Ю. М. Петрусевич, Б. Д. Рыжиков, В. В. Акимов, Н. В. Сокол

(кафедра молекулярной физики)

E-mail: petrova@phys.msu.su

С помощью метода поляризованной флуоресценции исследованы водные растворы бычьего сывороточного альбумина (BSA) при наличии в них малых концентраций ионов кадмия или хелата европия. Получены спектры люминесценции хелата европия в водном растворе при разных концентрациях и рН, а также спектры люминесценции раствора BSA с хелатом европия в зависимости от концентрации BSA и рН среды. Времена вращательной корреляции частиц в растворах, содержащих, кроме альбумина, ионы кадмия или комплексоны хелата европия, возрастают примерно на порядок по сравнению со временем вращательной корреляции собственно молекул альбумина. Этот результат может быть объяснен образованием белковых кластеров, что подтверждается также с помощью метода статического рассеяния света.

Введение

В последние годы в качестве маркирования биологических веществ для их изучения все чаще используются хелаты европия, как высокочувствительные метки [1]. Флуоресценция большинства белков и органических соединений имеет время релаксации в диапазоне $10^{-8} \div 10^{-9}$ с, а время возбужденного состояния лантаноидов находится в пределах $10^{-3} \div 10^{-6}$ с [2, 3]. К тому же флуоресценция белков происходит в ультрафиолетовой области, а при добавлении хелата европия в растворы с белком максимумы флуоресценции смещаются в видимую часть спектра.

Молекулы хелата европия представляют собой тяжелые клешнеобразные частицы, которые не диссоциируют в водных растворах. Комплексоны европия в растворах могут обладать как кислотными, так и основными свойствами. Они способны участвовать в реакциях окисления-восстановления и комплексообразования. Комплексоны обладают малой токсичностью, могут превращать токсичные частицы в малотоксичные, а продукты их разрушения не накапливаются в организме и безвредны. Однако превышение допустимой концентрации хелата европия в крови может создать угрозу здоровью человека, так как при этом происходит нарушение нормального течения физиологических процессов в организме.

Токсическое воздействие тяжелых металлов на живые организмы хорошо известно. Как показали предыдущие исследования [4–7] основными физическими механизмами действия тяжелых ионов являются: аномальная сорбция на поверхности липопротеинов, аномалия молекулярной подвижности заряженных биополимеров, образование дипольных белковых кластеров. По-видимому, аналогичные

процессы сопровождают и взаимодействие белков, в частности белков плазмы крови, с тяжелыми молекулами хелатов.

Работа посвящена изучению влияния молекул хелата европия, а также ионов кадмия на молекулярные параметры белка (бычьего сывороточного альбумина — BSA) в водных растворах, которые можно рассматривать в качестве модели биологической жидкости (например, сыворотки крови или лимфы). Исследования проводились с помощью методов поляризованной и спектральной флуоресценции, а также статического и динамического светорассеяния при изменении параметров среды — ионной силы раствора, определяемой концентрацией растворенных ионов; рН среды; а также концентрации альбумина в растворах.

Исследуемые системы

Макромолекулы белков представляют собой сложные полимерные структуры с молекулярной массой до нескольких сотен тысяч г/моль. На поверхности молекул белков могут находиться до нескольких сотен заряженных групп, что обуславливает большие значения дипольных моментов белковых молекул — до тысячи единиц дебай (D). В растворе белки представляют собой полиэлектролиты, при этом суммарный заряд на поверхности белка может изменяться в широких пределах в зависимости от концентрации свободных протонов. В нашей работе использовался BSA фирмы “Sigma” (молекулярный вес $M = 68\,000$ г/моль, дипольный момент 480 D, изоэлектрическая точка при рН 4.9).

Хелат европия (соединение трехвалентного иона Eu^{3+} и этилендиаминтетрауксусной кислоты $\text{EDTA} = (\text{HOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ ($M = 372.5$ г/моль) представляет собой комплексо-

Т а б л и ц а 1

**Эффективные массы рассеивающих частиц в растворах BSA + хелат европия
при разных рН и концентрациях хелата**

$C_{(EDTA)-Eu}$, мг/мл	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.000018	0.001	0.068	0.1
рН	6	5	4.9	4	7	5.6	4.9	4.9
$M \cdot 10^4$, г/моль	240	303	682	1940	64	4290	3160	13900

нат (чаще говорят комплексон) Eu. Он хорошо флуоресцирует из-за особенностей строения электронной оболочки [2, 3].

Термин «комплексоны» используется для обозначения органических лигандов группы полиаминополикарбоновых кислот. Лигандами в химии комплексных соединений называют нейтральные молекулы или анионы, которые координируются вокруг центрального атома.

Среди комплексонов EDTA — наиболее характерное, хорошо изученное и широко применяемое соединение. Молекула EDTA содержит 4 кислотных и 2 основных центра. Удачное сочетание и взаимное расположение этих центров сделало EDTA одним из наиболее эффективно действующих и универсальных комплексонов, нашедших весьма широкое и разнообразное применение.

В кислом растворе EDTA протонируется, образуя катион — кислоты $H_5(EDTA)^+$ и $H_6(EDTA)_2^+$, если $(EDTA)_4^-$ — анион четырехосновной кислоты.

Кадмий растворяется в органических кислотах, находящихся в пище, и образует соли, которые преобразуются в хлорид кадмия под действием желудочного сока. Известно, что даже малые количества кадмия могут приводить к серьезным отравлениям с летальным исходом. Особенно опасны респираторные отравления парами кадмия. В нашей работе использовались водные растворы BSA, содержащие малые концентрации соли $CdSO_4$. В тех случаях, когда исследовалась флуоресценция этих растворов, в них добавлялся флуоресцеин.

Исследуемые системы готовились непосредственно перед проведением экспериментов. В качестве растворителя использовалась дистиллированная вода. Навески производились на электронных аналитических весах, позволяющих проводить измерения с точностью до 0.1 мг (погрешность < 1%). Растворы объемом 2 см³ помещались в стеклянные кюветы, диаметром 15 мм. Для измерения значений водородного показателя среды применялся электронный рН-метр фирмы HANNA, который позволяет измерять рН с точностью до 0.05 ед. Для изменения значений рН растворителя применялись растворы HCl и KOH.

Исследование растворов альбумина, содержащих ионы кадмия и комплексоны хелата европия методами светорассеяния

С помощью метода статического светорассеяния было обнаружено, что в растворах BSA с ионами

кадмия ($CdSO_4$) возникают крупные частицы — дипольные кластеры, обладающие большой массой [7]. Массы таких частиц более чем на порядок превосходят молекулярную массу белка при рН, соответствующем изоэлектрической точке BSA [4, 7].

Для исследования растворов белка с хелатом европия методом статического рассеяния использовалась установка, описанная в работе [8]. Были изучены растворы альбумина при различных значениях рН и различных концентрациях хелата европия. Полученные данные, приведенные в табл. 1, показывают, что наличие в растворе молекул комплексона также приводит к росту эффективной массы рассеивающих частиц.

Исследование растворов BSA с хелатом европия и ионами кадмия с помощью флуоресцентных методов

1. Метод поляризованной флуоресценции. При облучении флуоресцирующего объема, содержащего раствор макромолекул, монохроматическим линейно-поляризованным светом параллельные и перпендикулярные составляющие интенсивности флуоресценции связаны следующим образом:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (1)$$

где P — степень поляризации флуоресценции частиц раствора, I_{\parallel} — и I_{\perp} — компоненты с поляризацией соответственно параллельной и перпендикулярной вектору поляризации возбуждающего света.

Из теории Левшина–Перрена для вращательной деполяризации люминесценции следует формула, связывающая молекулярные параметры флуоресцирующего объекта и его поляризацию [8]:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{kT\tau_{\text{fl}}}{V\eta}, \quad \tau_{\text{rot}} = \frac{V\eta}{kT} = \frac{\eta M}{\rho kT}, \quad (2)$$

где P_0 — значение предельной поляризации в предположении, что молекулы (испускающая и поглощающая) образуют неподвижную систему; τ_{fl} — время жизни флуоресценции, τ_{rot} — время вращательной корреляции молекул; V, M — объем и масса вращающегося фрагмента; ρ, η — плотность и вязкость раствора; T — температура; k — постоянная Больцмана.

Таким образом, из экспериментальных значений степени поляризации флуоресценции можно получить τ_{rot} и, считая частицы раствора сферическими, оценить их размеры и массу.

2. Описание экспериментальной установки.

Флуоресценция водных растворов белков изучалась в нашей работе на оптической установке с аргоновым лазером ($\lambda = 479$ нм) и фотоэлектронным детектором флуоресцентного излучения. Вертикально поляризованный пучок света через призму подавался на цилиндрическую стеклянную кювету с исследуемым раствором. Падающий луч модулировался электро-механическим прерывателем с частотой 70 Гц, что позволяло отделить сигнал от фоновой засветки. Люминесцентное излучение регистрировалось фотоэлектронным умножителем, сигнал с которого затем поступал на резонансный усилитель У2-6. Система, состоящая из светофильтра (раствор соли $K_2Cr_2O_4$ с концентрацией $1.5 \cdot 10^{-3}$ г/см³, пропускающего свет с длинами волн > 500 нм) и призмы Глана–Томсона, позволяла разделить поляризованную и деполяризованную компоненты флуоресцентного излучения и измерять их интенсивности.

Погрешность измерения интенсивности флуоресценции определялась, в частности, стабильностью излучения лазера, которая проверялась по интенсивности флуоресценции I_0 эталонного образца — раствора флуоресцеина. При этом $\Delta I_0/I_0$ не превышала 3% за время проведения эксперимента. Для уменьшения погрешности определения степени поляризации проводилось несколько повторных измерений. Суммарная ошибка всех измерений не превышала 10%.

Спектры люминесценции исследуемых растворов были получены с помощью спектрофлуориметра Хитачи (Hitachi MPF-4).

Экспериментальные результаты и обсуждение

Получены спектры люминесценции раствора хелата европия на длине возбуждения $\lambda_{ext} = 396$ нм для разных значений концентрации (EDTA)–Eu и pH раствора. На этих спектрах наблюдаются несколько максимумов люминесценции, в том числе слабо выраженные максимумы на $\lambda_n = 465$ нм и $\lambda_n = 525$ нм, а также на $\lambda_n = 590$ нм и 595 нм. В диапазоне длин волн λ_n от 605 до 620 нм имеются 4 максимума, которые при некоторых значениях концентрации хелата европия оказались неразрешенными.

Была исследована также зависимость интенсивности флуоресценции в спектрах раствора хелата европия от величины pH. Оказалось, что спектры имеют 3 наиболее выраженных максимума и характерную форму, практически не изменяющуюся при изменении величины pH. В табл. 2 приведены соответствующие максимумам значения интенсивности флуоресценции (в относительных единицах) от pH.

Некоторые из этих зависимостей интенсивности флуоресценции от pH приведены на рис. 1.

Также сняты спектры возбуждения раствора BSA + хелат европия при значениях длины волны

Таблица 2

Относительная интенсивность в максимумах спектра флуоресценции раствора хелата европия при различных pH среды

pH	3.4	5.2	5.53	6.1	7.7
I_1 ($\lambda = 512$ нм)	12	12.9	5.9	12.2	19.6
I_2 ($\lambda = 600$ нм)	3	6.3	3.3	10.75	18.7
I_3 ($\lambda = 622$ нм)	20.6	53	78.6	108.4	184.2

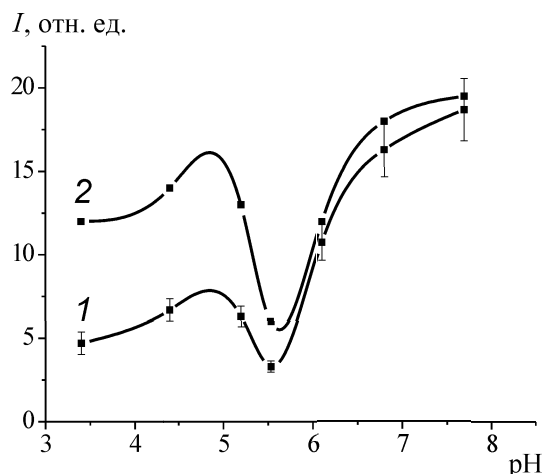


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции раствора хелата европия ($C_{(EDTA)-Eu} = 0.015$ мг/мл) от pH для различных длин волн спектра люминесценции: (1) 510 нм, (2) 600 нм

испускания 283 и 491 нм, которые имеют максимумы при 290 и 490 нм соответственно.

Спектр люминесценции раствора BSA + хелат европия при возбуждении на длине волны 283 нм имеет максимум при 340 нм, который, по-видимому, определяется флуоресценцией триптофана в белке. При возбуждении на длине волны 450 нм максимум флуоресценции наблюдается на 510 нм. Появление этой линии, видимо, является следствием взаимодействия белка и комплексона.

Из спектров флуоресценции раствора BSA + хелат европия при различных значениях концентрации BSA и различных pH были получены следующие зависимости (рис. 2). Как видно на рис. 2, а, зависимость относительной интенсивности в максимуме флуоресценции на длине волны 340 нм от концентрации белка практически линейная. На рис. 2, б изображены зависимости I от pH для различных значений концентрации альбумина. Эти зависимости, вероятно, отражают взаимодействие заряженных поверхностных групп белка с зарядами молекул комплексона.

Методом поляризованной флуоресценции исследовались растворы BSA с солью кадмия при постоянных концентрациях компонент. Получена зависимость степени поляризации флуоресценции растворов от концентрации флуоресцеина, который использовался в качестве зонда (рис. 3).

Как видно из рис. 3, степень поляризации P заметно увеличивается в случае, когда в растворе

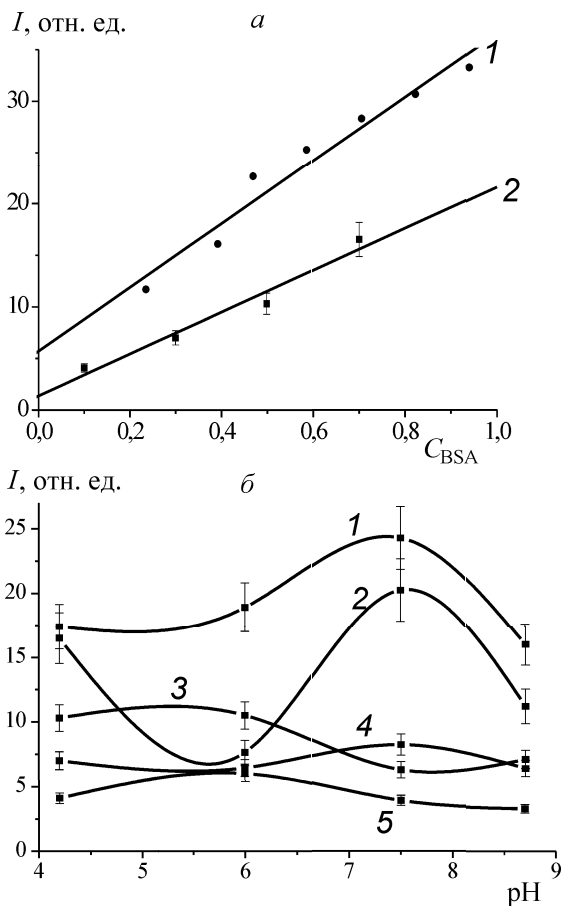


Рис. 2. Зависимости относительной интенсивности в максимуме флуоресценции: (а) от концентрации альбумина: (1) pH 5.6; (2) pH 4.2; (б) от pH при различных концентрациях белка: (1) $C_{BSA} = 1$ мг/мл; (2) $C_{BSA} = 0.7$ мг/мл; (3) $C_{BSA} = 0.5$ мг/мл; (4) $C_{BSA} = 0.3$ мг/мл; (5) $C_{BSA} = 0.1$ мг/мл

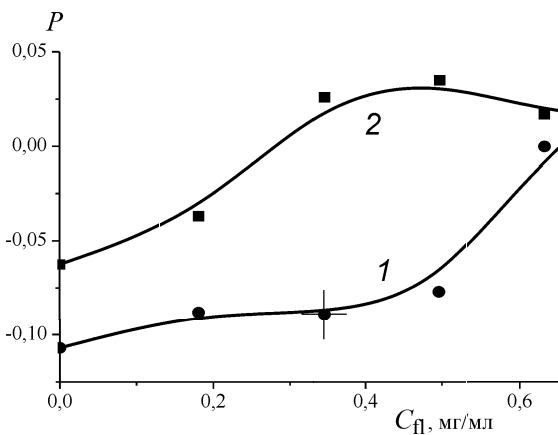


Рис. 3. Поляризация флуоресценции растворов (1) BSA ($C_{BSA} = 0.37$ мг/мл) + флуоресцеин; (2) BSA ($C_{BSA} = 0.37$ мг/мл) + $CdSO_4$ ($C_{CdSO_4} = 0.38$ мг/мл) + флуоресцеин, в зависимости от концентрации флуоресцеина

кроме белка и флуоресцеина присутствуют ионы кадмия (кривая 2). Это, по-видимому, можно объяснить увеличением τ_{tot} , а следовательно и ростом массы M флуоресцирующих частиц раствора, согласно формуле (2). По формуле (2) было рассчитано время вращательной корреляции для этих растворов. Оказалось, что в случае, когда раствор не содержит

кадмия, $\tau_{tot} = 11$ нс. Для растворов альбумина, содержащих соль кадмия, время вращательной корреляции оказалось равным 24 нс. Известно, что τ_{tot} для гидратированного белка равно 13 нс [9].

При возбуждении флуоресценции в растворах BSA + хелат европия на длине волны 479 нм (Ar-лазер) обнаружено, что интенсивность флуоресценции также зависит от pH (рис. 4), как и в случае возбуждения флуоресценции на длине волны 283 нм (рис. 2, а). Причем, та же интенсивность флуоресценции наблюдается в области pH 6, аналогично тому, что наблюдается в водном растворе хелата европия без белка.

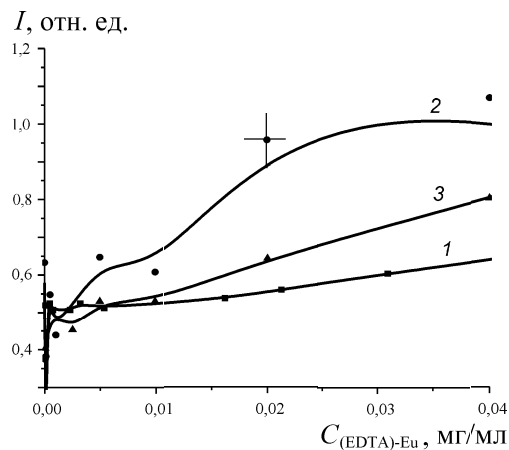


Рис. 4. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции растворов хелата европия при разных pH от концентрации хелата: (1) pH 5; (2) pH 6; (3) pH 7.5

На рис. 5 приведены зависимости относительной интенсивности флуоресценции растворов BSA + хелат европия при различных концентрациях последнего.

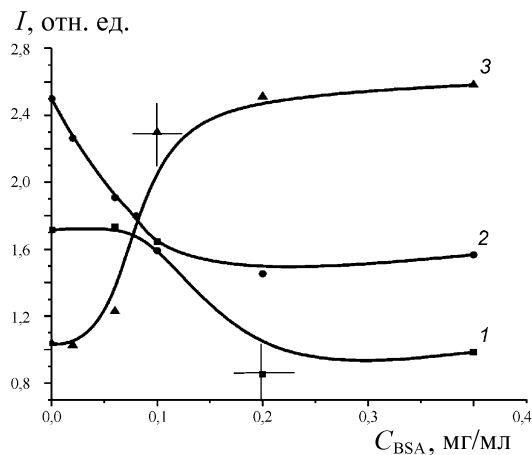


Рис. 5. Зависимости относительной интенсивности флуоресценции растворов BSA при различных концентрациях хелата Eu в изоэлектрической точке BSA от концентрации BSA: (1) $C_{EDTA-Eu} = 0.0005$ мг/мл, (2) $C_{EDTA-Eu} = 0.003$ мг/мл, (3) $C_{EDTA-Eu} = 0.068$ мг/мл

Как можно видеть из этого рисунка, при малых концентрациях BSA в растворах интенсивность флуоресценции определяется в основном флуоресценцией хелата европия, поэтому при малых концентрациях белка (до 0.1 мг/мл) наблюдается

уменьшение интенсивности флуоресценции при увеличении концентрации хелата вследствие концентрационного тушения. При больших концентрациях белка относительная интенсивность флуоресценции возрастает с увеличением концентрации молекул хелата в растворе.

В табл. 3 приведена зависимость интенсивности флуоресценции растворов от отношения молярных концентраций компонент системы.

Т а б л и ц а 3

Зависимость интенсивности флуоресценции растворов от отношения молярных концентраций альбумина и хелата европия

$\frac{C_{BSA}}{C_{(EDTA)-Eu}}$	0.4	0.5	0.8	0.9	1.1	1.5
I , отн. ед.	0.99	0.93	0.49	0.37	0.86	0.91

Зависимость представляет собой параболу. Убывающая ветвь параболы соответствует в основном флуоресценции молекул хелата европия, растущая — суммарной флуоресценции молекул хелата европия, присоединенных к белку, и свободных молекул хелата в растворе. Минимальная интенсивность наблюдается в том случае, когда на одну молекулу белка приходится примерно одна молекула комплексона.

На примере одной из снятых зависимостей величины $1/P$ от концентрации BSA (для раствора BSA + хелат европия, $C_{Eu} = 0.001$ мг/мл, pH = 5.6), с помощью линейной экстраполяции, определено время вращательной корреляции. Оказалось, что τ_{tot} изменяется от 30 до 110 нс. Это значение в 2–7 раз больше, чем τ_{tot} молекул альбумина в воде. В предположении, что частицы сферические, можно оценить эффективную массу частиц в растворе (кластеров). Для значений $\rho = 1.2$ г/л, $\eta = 0.01$ п: эффективная масса $M = 5.16 \cdot 10^5$ г/моль, что почти в 10 раз больше, чем масса молекулы альбумина в воде ($M = 7 \cdot 10^4$ г/моль).

Заключение

Методами рассеяния лазерного излучения и поляризованной флуоресценции исследовано образование макромолекулярных агрегатов — кластеров в растворах белков, содержащих ионы кадмия и комплексоны хелата европия.

Изучены особенности спектров флуоресценции этих систем при изменении концентрации компонент раствора и показателя pH.

В растворах альбумина, содержащих соль тяжелого металла, наблюдается увеличение коэффициента поляризации, что, по-видимому, связано с кластеризацией белка. Время вращательной корреляции частиц в растворах, содержащих ионы кадмия, возрастает больше чем в два раза по сравнению со временем вращательной корреляции молекул альбумина.

Интенсивность флуоресценции в водных растворах хелата европия изменяется при изменении параметра pH и достигает максимальной величины в области pH = 6. Полная интенсивность флуоресценции в растворах белка с хелатом европия существенным образом зависит от концентрации хелата и pH раствора. Времена вращательной корреляции частиц в растворах альбумина, содержащих хелат европия, возрастают примерно на порядок по сравнению со временем вращательной корреляции молекул альбумина в воде в результате образования белковых кластеров, что подтверждается методами статического рассеяния света.

Литература

1. Чудинов А.В., Жердева В.В. // Аллергия, астма и клиническая иммунология. 1999. № 9. С. 148.
2. Нанделли А., Палензон А. Физика и химия редкоземельных элементов. М., 1987.
3. Золин В.Ф., Гайдук М.И., Гайгерова Л.С. Спектры люминесценции европия. М., 1974.
4. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. // Gen. Physiol. and Biophys. 1998. 17, No. 2. P. 97.
5. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N., Ten D.I. // Proc. SPIE. 2001. 4263. P. 150.
6. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1998. № 4. С. 71.
7. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И. // Квант. электроника. 2002. № 10. С. 897.
8. Левшин В.Л. Фотолюминесценция жидких и твердых веществ. М., 1951.
9. Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.

Поступила в редакцию
25.03.03