

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 535.37; 532:541.64

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ РАСТВОРОВ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ Pb^{2+} И Na^+ **Г. П. Петрова, Н. В. Сокол***(кафедра молекулярной физики)*

E-mail: petrova@phys.msu.su

С помощью методов флуоресцентного анализа в видимом и ультрафиолетовом диапазонах длин волн проведено исследование растворов сывороточного альбумина с ионами металлов Na^+ , Pb^{2+} при изменении ряда параметров среды, таких как концентрация макромолекул, рН и ионная сила растворов. С помощью метода поляризации флуоресценции обнаружено образование наночастиц — белковых кластеров в водных растворах альбумина, содержащих ионы тяжелого металла — свинца. Данное исследование имеет практическое значение для решения задач экологии и медицины.

Несомненный интерес для современной науки представляет изучение влияния токсичных металлов на белковые системы. Поведение молекул белков в растворах определяется электростатическими (кулоновскими) взаимодействиями поверхностных зарядов. В работах [1, 2] было показано, что ионы тяжелых металлов (обладающие большими ионными радиусами) прочно связываются с зарядами на поверхности белковой макромолекулы. В этом случае существенную роль начинают играть силы диполь-дипольного взаимодействия. Макромолекулы белка сближаются на предельно допустимые расстояния, что приводит к образованию так называемых белковых нанокластеров.

В данной работе проведено сравнительное исследование растворов сывороточного альбумина (БСА), содержащих ионы металлов с различными ионными радиусами — Pb^{2+} и Na^+ — с помощью методов флуоресцентной спектроскопии и поляризации флуоресценции.

Метод флуоресцентного анализа является наиболее чувствительным для определения количественного содержания вещества в биологических образцах, кроме того исследование вращательной подвижности молекул в растворах может быть проведено с помощью метода поляризации флуоресценции. Вращательная подвижность частиц в растворах белка при добавлении токсичных ионов будет изменяться вследствие образования нанокластеров. Исследуя поляризацию флуоресценции белковых растворов, содержащих токсичные ионы, можно определить времена корреляции вращательной подвижности, которые напрямую связаны с массами и раз-

мерами частиц — нанокластеров, а также условия их образования в зависимости от параметров среды.

Согласно теории вращательной деполяризации люминесценции Левшина–Перрена [3], при поляризованном возбуждении справедливо соотношение

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

где P — наблюдаемая степень поляризации флуоресценции; P_0 — ее предельное значение в отсутствие деполяризации; V, M — объем и масса вращающейся молекулы; ρ — ее плотность; τ_{\parallel} — время жизни возбужденного состояния; τ_{rot} — время корреляции вращательной подвижности (перориентации) молекулы; η — вязкость раствора.

С помощью спектрофлуориметра «Perkin Elmer» было проведено исследование растворов альбумина с различными концентрациями ионов Pb^{2+} и Na^+ при возбуждении в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. Зависимости интенсивности флуоресценции растворов приведены на рис. 1, а.

Как можно видеть из рис. 1, а, наличие в растворе белка ионов свинца приводит к уменьшению относительной интенсивности флуоресценции по сравнению с интенсивностью флуоресценции в чистом растворе белка и в растворе БСА с ионами натрия. Эффект уменьшения значения интенсивности можно объяснить тушением флуоресценции в результате связывания ионов свинца с белком, при этом происходит также и агрегация частиц. Поляризация флуоресценции определялась по формуле

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (2)$$

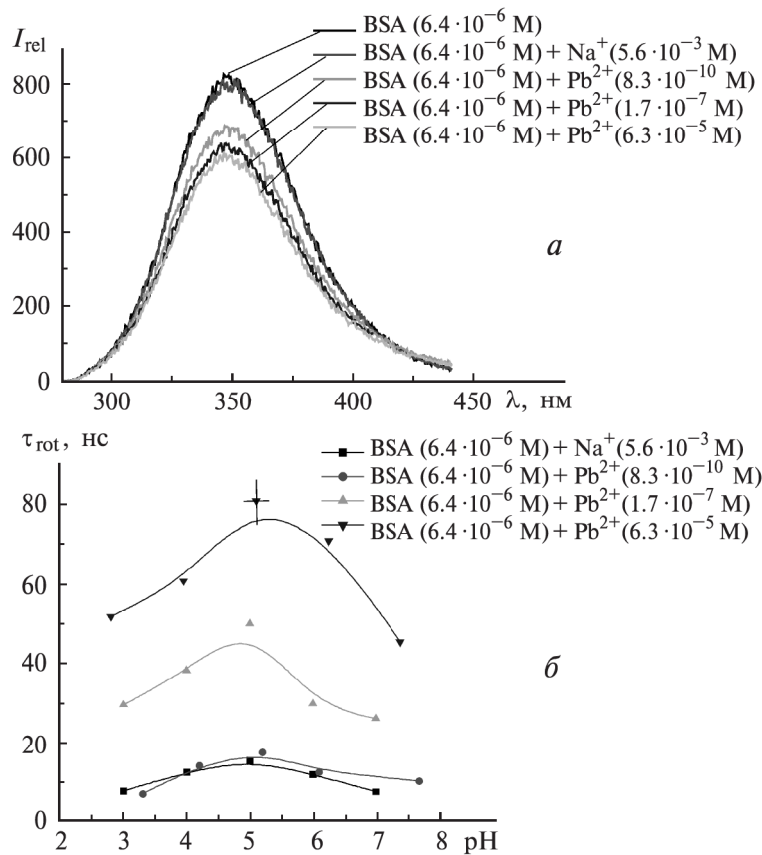


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции в растворах БСА, содержащих ионы металлов, при возбуждении на 270 нм (а) и зависимости от рН времени корреляции вращательной подвижности частиц в растворах БСА, содержащих ионы свинца и натрия (б)

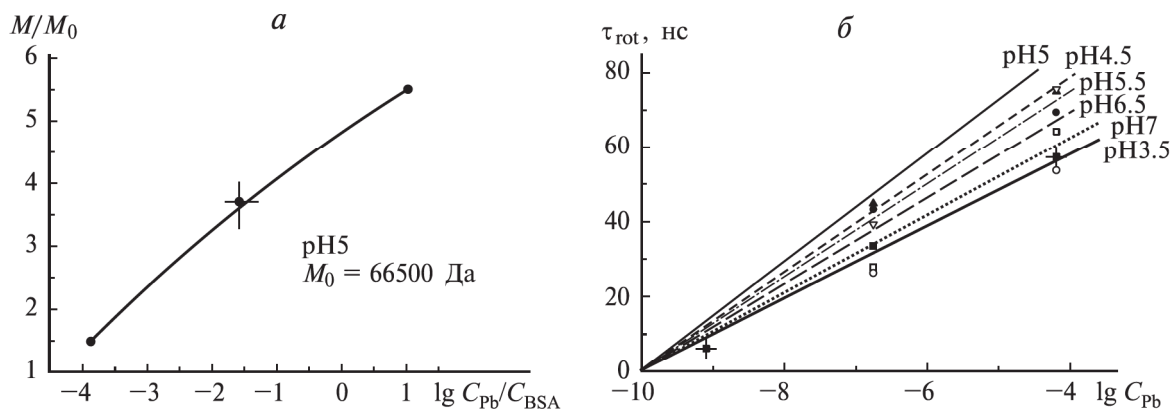


Рис. 2. Зависимость M/M_0 от $\lg(C_{Pb}/C_{BSA})$, рассчитанная из параметров флуоресценции растворов БСА + ацетат Рb (а) и зависимость времени корреляции вращательной подвижности от логарифма концентрации ацетата свинца в растворах БСА при разных рН (б)

где $I_{||}$ и I_{\perp} — интенсивности флуоресценции горизонтально и вертикально поляризованного испускания в случае возбуждения образца вертикально поляризованным светом.

Экспериментально определенные по формуле (1) времена корреляции вращательной подвижности частиц в растворах альбумина, содержащих ионы свинца, увеличиваются в 4–8 раз по сравнению с соответствующим значением τ_{rot} в растворе белка с ионами натрия (рис. 1, б). Максимальные вели-

ны времени корреляции вращательной подвижности наблюдаются в изоэлектрической точке белка, что связано с образованием дипольных кластеров. Силы диполь-дипольных взаимодействий между частицами в этой области рН максимальны, это приводит к росту массы кластеров и согласуется с результатами, полученными другими методами [2, 4].

На рис. 2, а приведен расчетный график зависимости отношения массы наночастиц к массе молекулы альбумина M/M_0 от логарифма отношения

молярных концентраций белка и ацетата свинца C_{Pb}/C_{BSA} при рН 5. Из графика видно, что отношение M/M_0 растет с ростом относительной концентрации свинца в растворах. На рис. 2, б показана зависимость времен t_{rot} корреляции вращательной подвижности частиц в растворах белка с ацетатом свинца, определенных по рис. 1, б, от логарифма концентрации свинца для различных значений рН.

Выводы

Исследование особенностей флуоресценции растворов сывороточного альбумина (BSA) с солями металлов Na^+ и Pb^{2+} в ультрафиолетовом диапазоне длин волн при изменении ряда параметров среды, таких как концентрация макромолекул, рН и ионная сила растворов, показало, что

1) наличие в растворах белка ионов легкого металла (Na^+) не приводит к увеличению времени корреляции вращательной подвижности и массы частиц;

2) наличие в растворах BSA ионов тяжелого металла (Pb^{2+}) приводит к увеличению времени корреляции вращательной подвижности частиц, что связано с образованием наноструктур — белковых кластеров;

3) значения времен корреляции вращательной подвижности частиц в растворах BSA, содержащих ионы Pb^{2+} , растут при увеличении ионной силы раствора и имеют максимумы в изоэлектрической точке белка.

Авторы признательны проф. А. С. Салецкому за предоставленную возможность провести измерения на спектрофлуориметре «Perkin Elmer».

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-02-17838).

Литература

1. Petrova G.P., Petrusevich Yu.M., Evseevicheva A.N. // Gen. Physiol. Biophys. 1998. N 17. С. 97.
2. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И. // Квант. электроника. 2002. № 32. С. 1.
3. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. М., 1994.
4. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Евсеевичева А.Н. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2003. № 2. С. 42 (Moscow University Phys. Bull. 2003. N 2. P. 49).

Поступила в редакцию
14.04.06