

Поляризованная флуоресценция в исследованиях вращательной диффузии маркеров семейства флуоресцеина в растворах бычьего сывороточного альбумина

И. М. Власова^{1,a}, А. А. Кулешова¹, А. А. Власов², А. М. Салецкий^{1,b}

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,

¹кафедра общей физики; ²кафедра квантовой теории и физики высоких энергий.

Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.

E-mail: ^avlasovairina1979@mail.ru, ^bsam@phys.msu.ru

Статья поступила 23.04.2014, подписана в печать 06.06.2014.

Проведен анализ поляризованной флуоресценции маркеров семейства флуоресцеина и определены параметры их вращательной диффузии в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА). В растворах с БСА увеличивается степень анизотропии флуоресценции маркеров, увеличивается время вращательной релаксации маркеров, при этом коэффициент вращательной диффузии маркеров уменьшается. Отличия в параметрах вращательной диффузии между маркерами определяются величиной электроотрицательности атомов в их структурных формулах: как в растворах без белка, так и с БСА увеличение электроотрицательности атомов в структурных формулах маркеров приводит к увеличению степени анизотропии их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации.

Ключевые слова: флуоресцеин, эозин, эритрозин, бенгальский розовый, бычий сывороточный альбумин, вращательная диффузия.

УДК: 535.372.3. PACS: 87.83.+a, 87.15.-v.

Введение

Флуоресцеин и его галогенопроизводные (тетрайодпроизводная — эритрозин, тетрабромпроизводная — эозин, тетрахлортетрайодпроизводная — бенгальский розовый) — это органические красители, обладающие ярко выраженной флуоресценцией. Спектр использования этих красителей чрезвычайно широк и охватывает разные области науки: биологию, медицину, экологию и т. п. В частности, флуоресцеин и его галогенопроизводные используют как маркеры при изучении поведения различных биологических макромолекул во взаимодействии с окружающей средой [1–4]. Заметные изменения в характеристиках флуоресценции таких маркеров при связывании их с биологическими макромолекулами открывают широкие возможности как для идентификации связывающих центров макромолекул, так и для изучения связывающих свойств этих центров при изменении внешних параметров среды (рН, вязкость, температура и т. п.).

Ранее нами изучены процессы молекулярной ассоциации маркеров семейства флуоресцеина в растворах сывороточного альбумина человека САЧ [5–8], флуоресценция маркеров семейства флуоресцеина в растворах САЧ [6–10], исследованы механизмы связывания маркеров семейства флуоресцеина с САЧ [11–14]. Также нами изучены процессы молекулярной ассоциации маркеров семейства флуоресцеина и их неполяризованная флуоресценция в растворах БСА, исследованы механизмы связывания маркеров семейства флуоресцеина с БСА [15, 16].

Выбор БСА и САЧ в наших работах, в частности, обусловлен уникальной способностью молекул БСА и САЧ связывать обширный круг органических и неорганических лигандов, определяющей одну из основных

функций этих белков — транспорт физиологических метаболитов и лекарственных препаратов в крови [1, 17].

В настоящей работе мы продолжаем начатые нами ранее исследования и рассмотрим поляризованную флуоресценцию маркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА и определим известным методом [2, 18–20] по анализу поляризованной флуоресценции параметры вращательной диффузии данных маркеров в растворах БСА при различных значениях рН.

1. Материалы и методы

Были подготовлены буферные растворы: 0.1 М $\text{CH}_3\text{COOH-KOH}$ (рН 3.5–5.0) и 0.1 М KH_2PO_4 — 0.1 М NaOH (рН 6.0–8.0). На их основе были приготовлены растворы (рН 3.5–8.0) соответствующего 30 мкМ маркера (флуоресцеин, эритрозин, эозин, бенгальский розовый) как без белка, так и содержащие 150 мкМ БСА (Sigma), в которые для анализа вращательной диффузии маркеров в растворах для вариации вязкости были добавлены различные концентрации сахарозы (0–200 мМ).

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре «Perkin Elmer LS55», спектрально-флуоресцентные характеристики образцов исследовались при комнатной температуре. Измерения флуоресценции образцов проводились через фиксированный интервал времени после добавления всех компонентов.

Флуоресценция маркеров в исследуемых растворах возбуждалась светом со следующими длинами волн: 1) флуоресцеин — $\lambda_{\text{excit}}^{\text{fluor}} = 440$ нм; 2) эритрозин — $\lambda_{\text{excit}}^{\text{erith}} = 530$ нм; 3) эозин — $\lambda_{\text{excit}}^{\text{eos}} = 520$ нм; 4) бенгальский розовый — $\lambda_{\text{excit}}^{\text{eos}} = 540$ нм.

Степень анизотропии r флуоресценции маркеров в растворах рассчитывалась по значениям I_{\parallel} и I_{\perp}

в максимуме спектров испускания флуоресценции маркеров, где I_{\parallel} и I_{\perp} — интенсивности свечений, поляризованных по двум взаимно перпендикулярным направлениям. Спектры флуоресценции маркеров обрабатывались программой Perkin Elmer FL Winlab.

2. Обсуждение результатов

Для оценки влияния БСА на поляризацию флуоресценции маркеров (флуоресцеин, эритрозин, эозин и бенгальский розовый) проведен сравнительный анализ степени анизотропии флуоресценции (r) маркеров при различных значениях pH как в растворах без белка, так и в растворах с БСА (рис. 1). Степень анизотропии флуоресценции маркеров в растворах рассчитывалась по значениям I_{\parallel} и I_{\perp} в максимуме спектров испускания их флуоресценции.

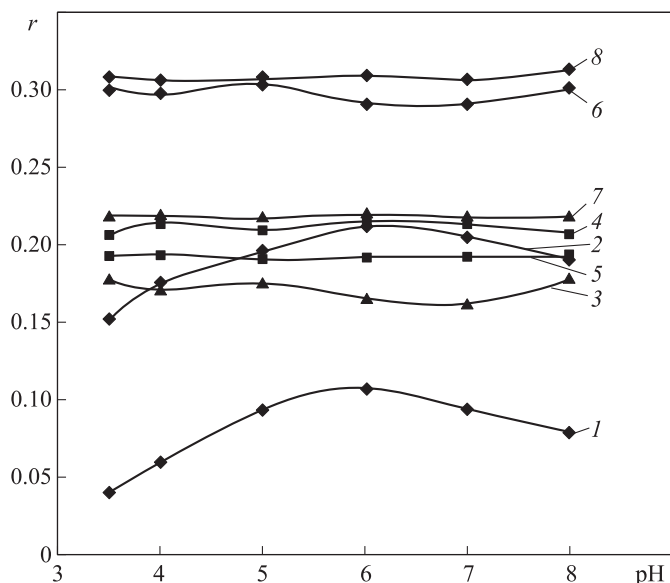


Рис. 1. Зависимость от pH степени анизотропии флуоресценции маркеров: 3 мкМ флуоресцеина (1, 2), 30 мкМ эритрозина (3, 4), 30 мкМ эозина (5, 6) и 3 мкМ бенгальского розового (7, 8) в растворах без белка (1, 3, 5, 7) и в растворах 150 мкМ БСА (2, 4, 6, 8)

Видно, что степень анизотропии r флуоресценции всех четырех маркеров семейства флуоресцеина в растворах с БСА больше, чем в растворах без белка, что объясняется их связыванием с белком.

При этом наблюдаются различия между флуоресцеином и его галогенопроизводными в зависимостях степени анизотропии флуоресценции r от pH.

Как в растворах без белка, так и в растворах БСА степень анизотропии r флуоресценции флуоресцеина нелинейно зависит от pH с максимумом при pH 6.0. При наличии слабо электроотрицательных атомов водорода в структурной формуле флуоресцеина основное влияние на вращательную диффузию маркера оказывают процессы ионизации флуоресцеина, определяемые значениями его pK, и процессы его молекулярной ассоциации, что приводит в свою очередь к нелинейному виду зависимости степени анизотропии флуоресценции маркера от pH.

Тогда как степень анизотропии r флуоресценции галогенопроизводных флуоресцеина (эритрозин, эозин и бенгальский розовый) не зависит от pH (в диапазоне $3.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$) как в растворах БСА, так и в растворах без белка, что объясняется наличием в молекулах этих маркеров сильноэлектроотрицательных атомов (бром, йод, хлор), затрудняющих изменения вращательной диффузии маркеров при вариации значений pH.

Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА наблюдается зависимость величины степени анизотропии флуоресценции маркеров от электроотрицательности атомов в их структурных формулах. По мере увеличения электроотрицательности атомов в структурных формулах маркеров значение степени анизотропии их флуоресценции возрастает. Степень анизотропии флуоресценции маркеров возрастает в ряду флуоресцеин — эритрозин — эозин — бенгальский розовый.

При сравнении значений степени анизотропии флуоресценции маркеров в растворах БСА, полученных в ходе данных исследований, и в растворах САЧ, полученных нами ранее, следует отметить, что в растворах с БСА по сравнению с растворами с САЧ степень анизотропии флуоресценции маркеров незначительно меньше.

Метод поляризованной флуоресценции позволяет оценивать параметры вращательной диффузии флуорофоров. На основе теории вращательной деполаризации флуоресценции выражение для степени поляризации P флуоресценции определяется как

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

где T — абсолютная температура, η — вязкость раствора, V — объем, k — постоянная Больцмана, τ_0 — среднее время жизни возбужденных молекул, P_0 — предельная степень поляризации флуоресценции.

Данная зависимость получила название формулы Левшина–Перрена. Таким образом, меняя вязкость растворов и откладывая на оси ординат $1/P$, а по оси абсцисс T/η , получаем прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/P_0$.

Тангенс угла наклона этой прямой к оси абсцисс

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

при известном значении τ_0 позволяет определить величину молекулярного объема

$$V = \frac{(3 - P_0) \cdot k \cdot \tau_0}{3 \cdot P_0 \cdot \text{tg } \varphi}$$

и, следовательно, эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна a , связанный с молекулярным объемом соотношением

$$V = \frac{4\pi a^3}{3}.$$

Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации ξ флуорофора по формуле

$$\xi = \frac{V\eta}{Tk},$$

где V — молекулярный объем. Для флуорофоров можно определить коэффициент вращательной диффузии D_{rot} :

$$D_{\text{rot}} = \frac{kT}{6\eta V}.$$

В настоящей работе путем варьирования вязкости растворов добавлением различных концентраций сахарозы определены время вращательной релаксации, коэффициент вращательной диффузии и эффективный радиус маркеров семейства флуоресцеина в растворах БСА при различных значениях рН.

При всех значениях рН в растворах с БСА коэффициент вращательной диффузии D_{rot} всех четырех маркеров семейства флуоресцеина меньше, чем в растворах без белка (табл. 1), что объясняется связыванием маркеров с белком.

Как в растворах БСА, так и в растворах без белка коэффициент вращательной диффузии (табл. 1) исходного соединения — флуоресцеина — нелинейно зависит от рН с минимумом при рН 6.0, а у галогенопроизводных флуоресцеина коэффициент вращательной диффузии практически не зависит от рН (при $3.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$).

В растворах без белка время вращательной релаксации ξ (табл. 2) маркеров семейства флуоресцеина существенно меньше, чем в растворах БСА, при всех исследованных значениях рН (3.5–8.0). Несвязанные с белком маркеры семейства флуоресцеина имеют небольшое время релаксации, меньшее времен жизни

их флуоресценции, что приводит к слабой поляризации флуоресценции маркеров в растворах без белка. Связанные с БСА маркеры имеют время релаксации, большее времен жизни их флуоресценции, что дает увеличение поляризации их флуоресценции в растворах с БСА по сравнению с растворами без белка.

В работе также определены значения эффективного радиуса Эйнштейна a маркеров семейства флуоресцеина (рис. 2) как в растворах БСА, так и в растворах без белка при различных значениях рН.

Как видно, в растворах без белка эффективный радиус Эйнштейна маркера практически соответствует реальному размеру молекулы маркера, а в растворах с БСА эффективный радиус маркера является не реальным размером, а представляет собой эффективный размер, отражающий процентное содержание связанного с белком маркера от его общего количества в растворе.

Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА эффективный радиус молекул флуоресцеина, определяемый из вращательной диффузии, нелинейно зависит от рН с максимумом при рН 6.0 (рис. 2, а). Как в растворах без белка, так и в растворах с БСА эффективный радиус молекул галогенопроизводных флуоресцеина (рис. 2, б), рассчитанный из вращательной диффузии, практически не зависит от рН (при $3.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$). Как видно, в растворах с БСА в каждом случае далеко не весь маркер связывается с белком (радиус БСА порядка 4.0 нм).

Таблица 1

Коэффициент вращательной диффузии (D_{rot} , 10^8 c^{-1}) маркеров семейства флуоресцеина, определенный по поляризованной флуоресценции, в растворах без белка и в растворах с БСА при различных значениях рН

рН	Флуоресцеин		Эритрозин		Эозин		Бенгальский розовый	
	без белка	с БСА	без белка	с БСА	без белка	с БСА	без белка	с БСА
3.5	1.80	0.38	1.00	0.08	0.90	0.06	0.81	0.05
4.0	1.52	0.36	0.98	0.08	0.93	0.06	0.80	0.05
5.0	1.41	0.23	0.99	0.09	0.93	0.06	0.80	0.05
6.0	1.20	0.19	1.00	0.09	0.92	0.06	0.81	0.05
7.0	1.40	0.23	0.99	0.09	0.93	0.06	0.80	0.05
8.0	1.47	0.31	0.99	0.08	0.92	0.06	0.81	0.05

Таблица 2

Время вращательной релаксации (ξ , нс) маркеров семейства флуоресцеина в растворах без белка и в растворах с БСА при различных значениях рН

рН	Флуоресцеин		Эритрозин		Эозин		Бенгальский розовый	
	без белка	с БСА	без белка	с БСА	без белка	с БСА	без белка	с БСА
3.5	0.9	4.3	1.7	19.8	1.9	26.9	2.1	29.8
4.0	1.1	4.6	1.7	20.1	1.8	26.5	2.1	30.9
5.0	1.2	7.2	1.7	19.6	1.8	26.5	2.1	30.9
6.0	1.4	8.8	1.7	19.6	1.8	26.9	2.1	30.3
7.0	1.2	7.3	1.7	18.7	1.8	26.5	2.1	29.8
8.0	1.1	5.5	1.7	19.2	1.8	26.2	2.1	30.9

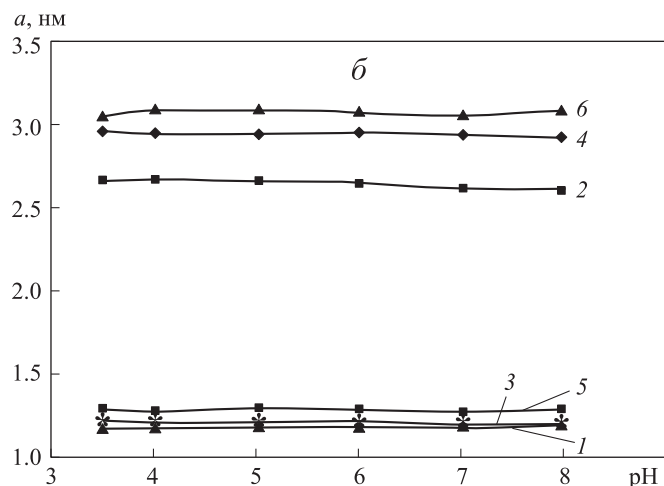
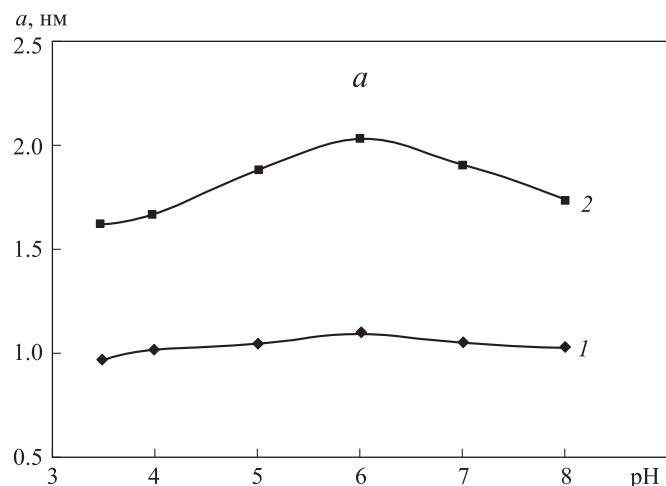


Рис. 2. Зависимость от pH эффективного радиуса флуоресцеина (а) в растворах без белка (1) и в растворах 150 мкМ БСА (2), галогенопроизводных флуоресцеина (б): эритрозина (1, 2), эозина (3, 4) и бенгальского розового (5, 6) в растворах без белка (1, 3, 5) и в растворах 150 мкМ БСА (2, 4, 6)

Заключение

В работе проведен анализ поляризованной флуоресценции маркеров семейства флуоресцеина (исходного соединения флуоресцеина и его галогенопроизводных — эритрозина, эозина и бенгальского розового) в растворах БСА, на основании которого определены параметры вращательной диффузии маркеров.

Обнаружено существенное изменение характеристик этих маркеров в растворах БСА по сравнению с растворами без белка: в растворах с БСА увеличивается степень анизотропии флуоресценции маркеров, увеличиваются время вращательной релаксации и эффективный радиус маркеров, при этом коэффициент вращательной диффузии маркеров уменьшается. Столь заметное изменение характеристик данных маркеров при связывании их с БСА дает широкие возможности как для идентификации связывающих центров биологических макромолекул, так и для изучения связывающих свойств этих центров при изменении внешних параметров среды (рН).

При сравнении маркеров семейства флуоресцеина между собой было обнаружено, что отличия в параметрах вращательной диффузии между маркерами определяются величиной электроотрицательности атомов в их структурных формулах. Увеличение электроотрицательности наблюдается в следующем направлении: водород (у флуоресцеина) — йод (у эритрозина) — бром (у эозина) — йод и хлор (у бенгальского розового). Нами обнаружено как в растворах без белка, так и с БСА, что увеличение электроотрицательности атомов в структурных формулах маркеров приводит к увеличению степени анизотропии их флуоресценции, к уменьшению коэффициента их вращательной диффузии, к увеличению времени их вращательной релаксации.

Список литературы

1. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М., 1989.

2. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. М., 1994.

3. Pelet S., Gratzel M., Moser J.-E. // J. Phys. Chem. B. 2003. **107**. P. 3215.

4. Birla L., Prieto B., Nogue T. et al. // Revue Roumaine Chimie. 2007. **52**, N 7. P. 639.

5. Бухарова Е.М., Власова И.М., Салецкий А.М. // Журн. прикладной спектроскоп. 2008. № 6. С. 782.

6. Власова И.М., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2009. № 4. С. 52 (Moscow University Phys. Bull. 2009. **64**, N 4. P. 412).

7. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Curr. Appl. Phys. 2009. **9**, N 5. P. 1027.

8. Власова И.М., Кулешова А.А., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2011. № 5. С. 44 (Moscow University Phys. Bull. 2011. **66**, N 5. P. 453).

9. Vlasova I.M., Bukharova E.M., Kuleshova A.A., Saletsky A.M. // Curr. Appl. Phys. 2011. **11**, N 5. P. 1126.

10. Vlasova I.M., Kuleshova A.A., Panchishin A.I., Vlasov A.A. // J. Mol. Struct. 2012. **1016**. P. 1.

11. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // J. Mol. Struct. 2009. **936**. P. 220.

12. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Laser Phys. Lett. 2008. **5**, N 11. P. 834.

13. Vlasova I.M., Saletsky A.M. // Laser Phys. Lett. 2008. **5**, N 5. P. 384.

14. Власова И.М., Гордеева Ю.А., Власов А.А., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2012. № 2. С. 60 (Moscow University Phys. Bull. 2012. **67**, N 2. P. 208).

15. Власова И.М., Кулешова А.А., Власов А.А., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2013. № 4. С. 39 (Moscow University Phys. Bull. 2013. **68**, N 4. P. 304).

16. Vlasova I.M., Kuleshova A.A., Vlasov A.A., Saletsky A.M. // J. Mol. Struct. 2013. **1051**. P. 86.

17. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. М., 1994.

18. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М., 2007.

19. Власова И.М., Бухарова Е.М., Салецкий А.М. // Журн. физ. хим. 2011. **85**, № 5. С. 964.

20. Власова И.М., Салецкий А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2011. № 1. С. 58 (Moscow University Phys. Bull. 2011. **66**, N 1. P. 59).

Polarized fluorescence in investigation of rotational diffusion of the fluorescein family markers in bovine serum albumin solutions**I. M. Vlasova^{1,a}, A. A. Kuleshova¹, A. A. Vlasov², A. M. Saletsky^{1,b}**¹Department of General Physics; ²Department of Quantum Theory and High Energy Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.E-mail: ^a vlasovairina1979@mail.ru, ^b sam@phys.msu.ru.

The analysis of polarized fluorescence of the fluorescein family markers was conducted and parameters of their rotational diffusion in bovine serum albumin solutions (BSA) were determined. The degree of fluorescence anisotropy of the markers increases in the BSA solutions, as well as the time of rotational relaxation of the markers, while the rotational-diffusion coefficient of the markers decreases. The differences in the rotational-diffusion parameters between the markers are determined by the values of the electronegativity of the atoms in their structural formulas: the increase of the electronegativity of the atoms in the structural formulas of the markers results in the increase of the degree of fluorescence anisotropy, a decrease of the rotational-diffusion coefficient, and in the increase of the rotational-relaxation time both in the solutions without the protein and with BSA.

Keywords: fluorescein, eosin, erythrosine, Rose Bengal, bovine serum albumin, rotational diffusion.

PACS: 87.83.+a, 87.15.-v.

*Received 23 April 2014.*English version: *Moscow University Physics Bulletin* 5(2014).**Сведения об авторах**

1. Власова Ирина Михайловна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: vlasovairina1979@mail.ru.
2. Кулешова Анна Александровна — аспирантка; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: ak2210first@yandex.ru.
3. Власов Александр Анатольевич — доктор физ.-мат наук, вед. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-16-47, e-mail: aav1956@mail.ru.
4. Салецкий Александр Михайлович — доктор физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой; тел.: (495) 939-14-89, e-mail: sam@phys.msu.ru.