

УДК 547.96, 543.42, 544.164

## ПРИМЕНЕНИЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДИК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

В.С. Сибирцев

Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

Адрес для переписки: [vs1969r@mail.ru](mailto:vs1969r@mail.ru)

### Информация о статье

Поступила в редакцию 10.12.18, принята к печати 12.12.18

doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-27-32

Язык статьи – русский

**Ссылка для цитирования:** Сибирцев В.С. Применение фотолюминесцентных методик для изучения динамики структуры белков в водных растворах // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. Т. 19. № 1. С. 27–32. doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-27-32

### Аннотация

Разработана методика, позволяющая изучать изменение пространственной структуры белковых молекул в их низкоконцентрированных водных растворах. Состояние молекул при этом приближено к состоянию, в котором они находятся в живых организмах, активно участвуя, в качестве ферментов, в регуляции метаболизма последних. Изучены синхронные спектры фотофлуоресценции водных растворов молочного белка казеина, регистрируемые в видимой и ближней ультрафиолетовой областях при различных сдвигах длин волн эмиссии относительно длины волны возбуждения ( $D_{wl}$ ). Зафиксированы значимые различия как в интенсивности, так и в положении пиков светорассеяния и собственной молекулярной фотофлуоресценции водных растворов казеина не только при разной концентрации в них белковой составляющей, но и разном времени нахождения казеина в растворенном состоянии. Это, по-видимому, обусловлено различиями пространственной структуры белковых молекул в исследуемых растворах (определяемыми, в свою очередь, разной степенью водородного и ван-дер-ваальсова взаимодействия данных высокомолекулярных соединений с окружающими их молекулами воды). Продemonстрировано, что фотолюминесцентные методики предоставляют исследователю достаточно простой, надежный и информативный способ изучения как термодинамических, так и кинетических аспектов взаимодействия белковых молекул, находящихся в состоянии, близком к нативному, с окружающими их молекулами других веществ (включая воду). Для этого могут быть использованы синхронные спектры собственной молекулярной фотофлуоресценции водных белковых растворов, регистрируемые при  $D_{wl} = 10$  нм в области длин волн возбуждения от 230 до 600 нм. Аналогичные спектры, регистрируемые при  $D_{wl} = 0$  и 90 нм, могут быть рекомендованы для более точного количественного определения содержания белков в водных растворах.

### Ключевые слова

люминесценция белков, светорассеяние упругое растворов полипептидов, белков структура пространственная

## APPLICABILITY OF PHOTOFLUORESCENT TECHNIQUES FOR RESEARCH OF PROTEIN STRUCTURE DYNAMICS IN AQUEOUS SOLUTIONS

V.S. Sibirtsev

ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation

Corresponding author: [vs1969r@mail.ru](mailto:vs1969r@mail.ru)

### Article info

Received 10.12.18, accepted 12.12.18

doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-27-32

Article in Russian

**For citation:** Sibirtsev V.S. Applicability of photofluorescent techniques for research of protein structure dynamics in aqueous solutions. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 27–32 (in Russian). doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-27-32

### Abstract

**Subject of research.** This paper presents developed techniques for research of the spatial structure changes of protein molecules when the state of these molecules is close enough to that one in living organisms, actively participating, as enzymes, in regulating the metabolism of the latter. **Method.** The synchronous photofluorescence spectra of aqueous solutions of casein milk protein were studied in the visible and near ultraviolet regions at different shifts of emission

wavelengths relative to excitation wavelength ( $D_{wl}$ ). **Main results.** Significant differences were observed both in the intensity and in the position of light scattering peaks and the own molecular photofluorescence of casein water solutions not only at different concentrations of the protein component in them, but also depending on the duration of casein presence in a dissolved state. Apparently, this fact was due to the differences in the spatial structure of protein molecules in the studied solutions (determined, in turn, by different degrees of hydrogen and Van der Waals interactions of these high-molecular compounds together with the water molecules surrounding them). **Practical relevance.** It was demonstrated that photoluminescence techniques provide the researcher with a fairly simple, reliable and informative way of studying both thermodynamic and kinetic aspects of the interaction of protein molecules, which are in a state close to the native, with the surrounding molecules of the other substances (including water). The synchronous spectra of the intrinsic molecular photofluorescence of aqueous protein solutions can be used for this, which are recorded at  $D_{wl} = 10$  nm in the excitation wavelength range from 230 to 600 nm. Whereas similar spectra recorded at  $D_{wl} = 0$  and 90 nm can be recommended for more sensitive quantitative determination of the protein content in aqueous solutions.

#### Keywords

protein luminescence, elastic light scattering of polypeptide solutions, protein space structure

### Введение

Белки являются одним из важнейших биоорганических соединений. И связано это в первую очередь с ферментативными функциями, которые они выполняют в метаболических процессах, протекающих в живых организмах и биотехнологических системах. А осуществление этих функций, в свою очередь, теснейшим образом связано с пространственной структурой белковых молекул, малейшие изменения которой существенно влияют на биологическую активность энзимов и соответствующим образом отражаются на жизнедеятельной активности организмов, в состав которых они входят. В связи с этим весьма актуальной задачей является изучение динамики изменения пространственной структуры белковых молекул, находящихся в состоянии, достаточно близком к тому, в котором они функционируют в живых организмах.

Однако основные методы исследования пространственного строения высокомолекулярных соединений (такие как рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, инфракрасная спектроскопия и т.п.) [1–4] позволяют изучать структуру белков в основном в статическом, кристаллическом, высококонцентрированном, неактивном состоянии. Кроме того, эти методы требуют длительных, сложных и плохо поддающихся стандартизации процедур пробоподготовки, дополнительно изменяющих нативную пространственную структуру белков, в которой они проявляют свою ферментативную и иную биологическую активность, находясь непосредственно в составе живых организмов. Методы спектроскопии комбинационного рассеяния или оптического дихроизма (линейного либо кругового) [5–8] позволяют анализировать непосредственно водные растворы белков, но для их использования тоже требуются высокие концентрации белков (при которых пространственная структура молекул белка также существенно отличается от нативной).

И наконец, все эти методы (так же как и метод времязазрешенной флуоресценции [9]) требуют весьма дорогого и, как правило, достаточно уникального оборудования, сложного по своим техническим характеристикам, исполнению и особенностям эксплуатации. Так что результаты, получаемые любым из вышеперечисленных методов для одних и тех же исследуемых белковых систем с помощью разных приборов, разными исследователями, либо с применением различных способов пробоподготовки, как правило, существенно различаются.

### Материалы и методы

Для изучения низкоконцентрированных водных белковых растворов (в которых белки находятся в состоянии, близком к нативному) был применен достаточно стандартизированный и отлаженный метод регистрации спектров светорассеяния и фотолюминесценции [10–22]. Данные спектры регистрировались в видимой и ближней ультрафиолетовой областях длин волн с помощью флуориметра «СМ-2203» (Беларусь) с импульсной лампой (способной возбуждать при обычном режиме регистрации только фотофлуоресценцию либо светорассеяние исследуемых образцов) при ширине щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии 3 нм. В качестве модельного полипептида выбран белок молока казеин (поскольку он не только легкодоступен и достаточно хорошо изучен к настоящему времени, но и обладает большей, чем у многих белков, значительной молекулярной массой и развитой пространственной структурой). Фотофлуоресценция растворов казеина в дистиллированной воде регистрировалась не только при разных концентрациях белка и различных сдвигах длин волн эмиссии относительно возбуждения ( $D_{wl}$ ), но и при разном времени нахождения белка в растворенном состоянии. При этом к исследуемым растворам добавлялись NaCl в количестве 2 г/л (для создания условий, близких к нативным, поскольку пространственная структура белков зависит, в том числе и от концентрации солей в растворе) и HCl в количестве, обеспечивающем у раствора  $pH=4,4\pm 0,2$  (для ингибирования развития посторонней микрофлоры без существенного изменения нативной пространственной структуры казеина).

### Результаты и их обсуждение

Данные, полученные описанным выше способом, представлены на рис. 1 и 2. Наибольшую структурированность (исходя из которой можно точнее судить о динамике изменения пространственной структуры белковых молекул в растворах) демонстрировали синхронные спектры собственной молекулярной фотофлуоресценции водных растворов казеина, регистрировавшиеся при  $D_{wl} = 10$  нм. Относительная интенсивность флуоресценции ( $I$ ) в этих спектрах при разных длинах волн существенно зависит не только от концентрации исследуемых растворов (рис. 1, *а*), но и от времени нахождения белка в растворенном состоянии (рис. 1, *б*). Исследуемый раствор выдерживался при  $+4$  °С и  $pH=3,0$  (для ингибирования развития посторонней микрофлоры), непосредственно перед измерением фотолюминесценции кювета нагревалась до  $+20$  °С.

С помощью данных спектров можно изучать не только термодинамические, но и кинетические аспекты взаимодействия молекул белка в растворах с молекулами других веществ (включая воду). Однако для корректной регистрации и интерпретации этих спектров необходимо спектрофлуоресцентное оборудование с достаточно высоким отношением полезного сигнала к шуму в диапазоне длин волн от 230 до 530 нм (или хотя бы от 270 до 390 нм), а также отсутствие в исследуемых образцах примесей, интенсивно поглощающих, а тем более излучающих свет в указанном диапазоне длин волн.

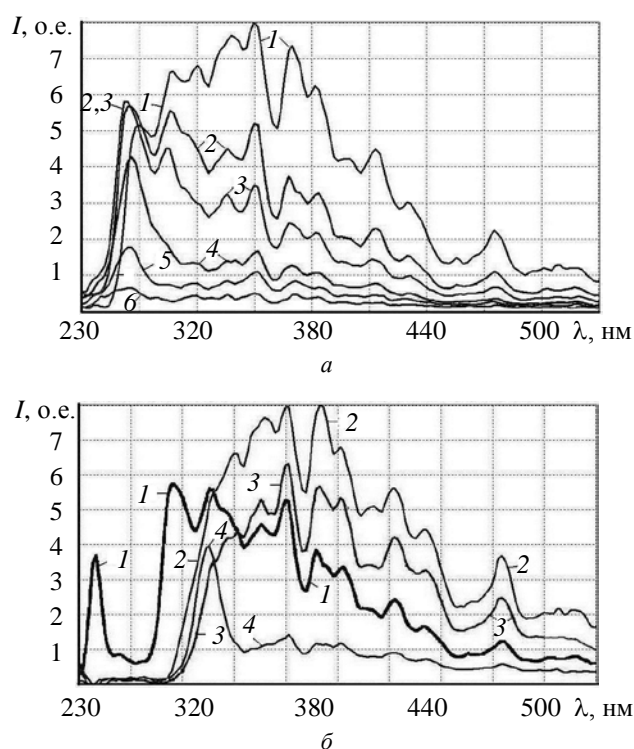


Рис. 1. Синхронные спектры фотофлуоресцентного возбуждения водных растворов казеина:  
*а* – свежеприготовленный раствор, концентрация 1 – 25, 2 – 10, 3 – 5, 4 – 1,3, 5 – 0,3, 6 – 0,08 г/л;  
*б* – концентрация казеина 10 г/л, время выдержки раствора 1 – 0, 2 – 2, 3 – 8, 4 – 20 суток

Спектры упругого светорассеяния казеина (регистрировавшиеся как синхронные спектры фотофлуоресценции при  $D_{wl} = 0$ ) имели для исследуемых растворов наибольшую интенсивность. Поэтому данные спектры могут быть рекомендованы для количественного определения содержания белков в низкоконцентрированных водных растворах (а также, в определенной степени, и для качественного – например, по соотношению интенсивностей упругого светорассеяния исследуемых растворов при 250 и 350 или 500 нм, как видно из рис. 2, *а*). Однако при этом нужно учитывать, что характер этих спектров в существенно большей степени, чем при других режимах регистрации, может зависеть от характера возбуждающего излучения, а также от присутствия в исследуемых образцах в растворенном либо коллоидном состоянии небелковых соединений, способных к интенсивному светорассеянию (таких как полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и т.п.).

Для количественного определения содержания белков в водных растворах могут быть рекомендованы синхронные спектры, регистрируемые при  $D_{wl} = 90$  нм (см. рис. 2). По сравнению с аналогичными спектрами при  $D_{wl} = 10$  нм, эти спектры существенно менее структурированы, но зато они имеют значительно большую интенсивность, меньше зависят от наличия в исследуемых образцах небелковых примесей (включая даже свободные аминокислоты, пептиды и т.п.). Существенно меньшая зависимость от по-

сторонних примесей отличает синхронные спектры фотофлуоресценции, регистрируемые для водных белковых растворов при  $D_{wl} = 90$  нм, и от аналогичных спектров, регистрируемых при  $D_{wl} = 0$  (хотя последние и значительно более интенсивны, а также пригодны для работ с существенно более широким диапазоном концентраций белковых растворов). Кроме того, как видно из рис. 2,  $\varepsilon$ , синхронные спектры фотофлуоресценции, регистрируемые при  $D_{wl} = 90$  нм, в определенной мере пригодны и для качественной характеристики состояния пространственной структуры белковых молекул в их водных растворах (например, по сдвигу пика в области 245–230 нм).

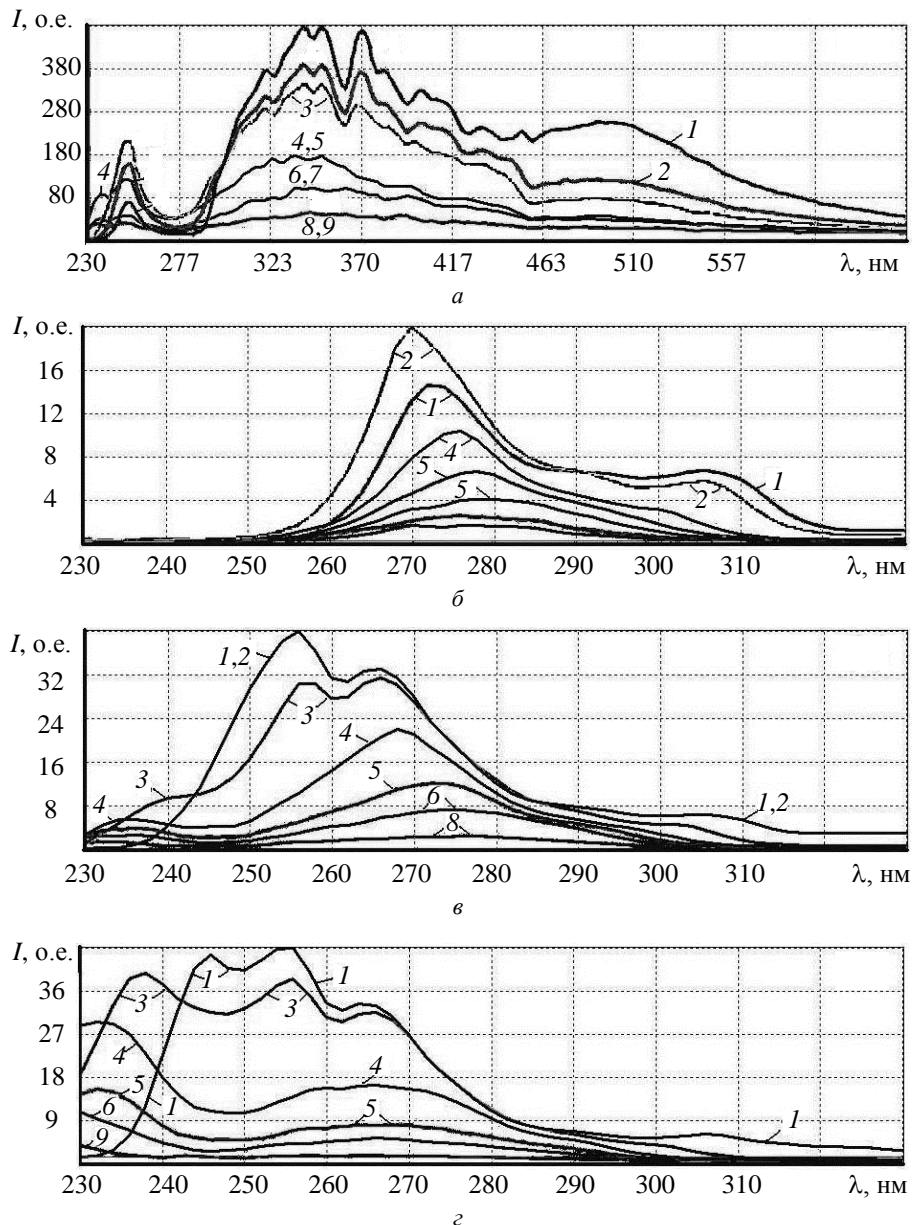


Рис. 2. Синхронные спектры фотофлуоресцентного возбуждения свежеприготовленных водных растворов казеина, регистрировавшиеся при  $D_{wl}=0$  (а), 30 (б), 60 (в) и 90 (г) нм; концентрация казеина 1 – 25, 2 – 10, 3 – 5, 4 – 1,3, 5 – 0,6, 6 – 0,3, 7 – 0,15, 8 – 0,08, 9 – 0,04 г/л

### Заключение

Регистрация синхронных спектров фотолюминесценции предоставляет исследователю достаточно простой, надежный и информативный способ изучения динамики изменения пространственной структуры белковых молекул в состоянии, близком к тому, в котором они находятся непосредственно в живых организмах (активно участвуя при этом, в частности, в регуляции метаболизма последних).

Так, в частности, используя даже такое достаточно дешевое, доступное, стандартизированное по своим характеристикам, простое и надежное в эксплуатации оборудование, как спектрофлуориметр «СМ 2203» (Беларусь), удалось зафиксировать значимые различия как в интенсивности, так и в положении

пиков упругого светорассеяния и фотофлуоресценции (при синхронном режиме ее регистрации) водных растворов казеина не только при разной концентрации, но и разном времени пребывания казеина в растворенном состоянии. Это, по-видимому, обусловлено различиями в пространственной структуре белковых молекул в исследуемых растворах (определяемыми, в свою очередь, разной степенью водородного и ван-дер-ваальсова взаимодействия данных высокомолекулярных соединений с окружающими их молекулами воды).

Таким образом, с помощью фотолюминесцентных методик можно изучать как термодинамические, так и кинетические аспекты взаимодействия молекул белка, находящихся в состоянии, близком к нативному, с окружающими их молекулами других веществ (включая воду).

## Литература

## References

1. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Tissue optical properties // In: *Handbook of Biomedical Optic*. CRC Press, 2011. P. 67–100. doi: 10.1201/b10951-7
2. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kozintseva M.D., Kochubei V.I., Gorodkov S.Yu., Tuchin V.V. Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm // *Optics and Spectroscopy*. 2016. V. 120. N 1. P. 1–8. doi: 10.1134/S0030400X16010045
3. Nepomniashchaia E.K., Cheremiskina A.V., Velichko E.N., Aksenov E.T., Bogomaz T.A. Studies of albumin using a combination of laser correlation spectroscopy and dielectric spectroscopy // *Journal of Optical Technology*. 2016. V. 83. N 5. P. 305–308. doi: 10.1364/jot.83.000305
4. Plotnikova L.V., Nechiporenko A.P., Orekhova S.M., Plotnikov P.P., Ishevski A.L. A study of muscular tissue of animal origin by reflection-spectroscopy methods // *Optics and Spectroscopy*. 2017. V. 122. N 6. P. 1015–1018. doi: 10.1134/s0030400x17060157
5. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I.U. Raman spectroscopy of biological tissues // *Applied Spectroscopy Reviews*. 2007. V. 42. N 5. P. 493–541. doi: 10.1080/05704920701551530
6. Orr L.E. Raman Spectroscopy of Biological Tissue for Application in Optical Diagnosis of Malignancy. PhD Dis. Thesis. Cranfield University, 2010. 309 p.
7. Burova T.G., Shcherbakov R.S. Quantum-mechanical analysis of the intensity distribution in spectra of resonant raman scattering spectra of aqueous solutions of tyrosine // *Optics and Spectroscopy*. 2016. V. 120. N 5. P. 721–725. doi: 10.1134/s0030400x16050052
8. Timchenko P.E., Timchenko E.V., Dolgushkin D.A., Volova L.T., Markova M.D. Application of Raman spectroscopy to assess the condition of bone and cartilaginous biopsy specimens // *Journal of Optical Technology*. 2017. V. 84. N 6. P. 423–425. doi: 10.1364/jot.84.000423
9. Kogan B.Ya., Butenin A.V., Galov A.P. Measurement of lifetimes of triplet states of organic molecules by fluorescence recovery kinetics. *Optics and Spectroscopy*. 2016. V. 120. N 2. P. 280–282. doi: 10.1134/s0030400x16010100
10. Сибирцев В.С., Гарабадзхи А.В., Иванов С.Д. Механизмы изменения флуоресцентных свойств бисбензимидазольных красителей // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. № 9. С. 731–736.
11. Сибирцев В.С., Гарабадзхи А.В., Иванов С.Д. Спектральные свойства красителей бес бензимидазольного ряда при взаимодействии с ДНК // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. № 12. С. 969–978.
12. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V. Effect of heteroatom on the spectral properties of benzazoles // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 1997. V. 33. N 12. P. 1756–1759.
13. Sibirtsev V.S., Glibin E.N., Ivanov S.D. Variation of spectral properties of actinocin derivatives due to equilibrium transformations // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2000. V. 36. N 12. P. 1812–1818.
14. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Comparative study of DNA-specific dyes of the indole and benzimidazole series // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2001. V. 27. N 1. P. 57–65.
15. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V.F. Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1995, vol. 21, no. 9, pp. 731–736. (in Russian)
11. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1997, vol. 23, no. 12, pp. 857–866.
12. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V. Effect of heteroatom on the spectral properties of benzazoles. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 1997, vol. 33, no. 12, pp. 1756–1759.
13. Sibirtsev V.S., Glibin E.N., Ivanov S.D. Variation of spectral properties of actinocin derivatives due to equilibrium transformations. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2000, vol. 36, no. 12, pp. 1812–1818.
14. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Comparative study of DNA-specific dyes of the indole and benzimidazole series. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1, pp. 57–65.
15. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V.F. Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2003, vol. 39, no. 6, pp. 881–889. doi:

- of Organic Chemistry, 2003. V. 39. N 6. P. 881–889. doi: 10.1023/b:rujo.0000003169.96393.1d
16. Sibirtsev V.S. Study of applicability of the bifunctional system "Ethidium bromide + Hoechst-33258" for DNA analysis // *Biochemistry (Moscow)*, 2005. V. 70. N 4. P. 449–457. doi: 10.1007/s10541-005-0136-x
  17. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Kovaleva M.V., Garabadzhiu A.V., Traven V.F. Spectral study of interactions of 4,8,4'-trimethylpsoralen and 4,4'-dimethylangelicin dyes with DNA // *Biochemistry (Moscow)*, 2005. V. 70. N 7. P. 822–832. doi: 10.1007/s10541-005-0190-4
  18. Sibirtsev V.S. Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application // *Biochemistry (Moscow)*, 2007. V. 72. N 8. P. 887–900. doi: 10.1134/S0006297907080111
  19. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V. Spectral study of the interaction of DNA with benzothiazolyl-benz-a-chromene // *Biochemistry (Moscow)*, 2007. V. 72. N 8. P. 901–909. doi: 10.1134/s0006297907080123
  20. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2014. V. 11. N 3. P. 400–408. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
  21. Plotnikova O.A., Mel'nikov A.G., Mel'nikov G.V., Gubina T.I. Quenching of tryptophan fluorescence of bovine serum albumin under the effect of ions of heavy metals // *Optics and Spectroscopy*, 2016. V. 120. N 1. P. 65–69. doi: 10.1134/s0030400x16010148
  22. Sibirtsev V.S. Investigation of mechanisms of change in spectral properties during interaction of benzazole, indole, and phenanthridium compounds with DNA // *Journal of Optical Technology*, 2017. V. 84. N 5. P. 294–301. doi: 10.1364/jot.84.000294
  - 10.1023/b:rujo.0000003169.96393.1d
  16. Sibirtsev V.S. Study of applicability of the bifunctional system "ethidium bromide + Hoechst-33258" for DNA analysis. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, vol. 70, no. 4, pp. 449–457. doi: 10.1007/s10541-005-0136-x
  17. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Kovaleva M.V., Garabadzhiu A.V., Traven V.F. Spectral study of interactions of 4,8,4'-trimethylpsoralen and 4,4'-dimethylangelicin dyes with DNA. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, vol. 70, no. 7, pp. 822–832. doi: 10.1007/s10541-005-0190-4
  18. Sibirtsev V.S. Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, no. 8, pp. 887–900. doi: 10.1134/S0006297907080111
  19. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V. Spectral study of the interaction of DNA with benzothiazolyl-benz-a-chromene. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, no. 8, pp. 901–909. doi: 10.1134/s0006297907080123
  20. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2014, vol. 11, no. 3, pp. 400–408. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
  21. Plotnikova O.A., Mel'nikov A.G., Mel'nikov G.V., Gubina T.I. Quenching of tryptophan fluorescence of bovine serum albumin under the effect of ions of heavy metals. *Optics and Spectroscopy*, 2016, vol. 120, no. 1, pp. 65–69. doi: 10.1134/s0030400x16010148
  22. Sibirtsev V.S. Investigation of mechanisms of change in spectral properties during interaction of benzazole, indole, and phenanthridium compounds with DNA. *Journal of Optical Technology*, 2017, vol. 84, no. 5, pp. 294–301. doi: 10.1364/jot.84.000294

#### Авторы

**Сибирцев Владимир Станиславович** – кандидат химических наук, доцент, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, Scopus ID: 6603964394, ORCID ID: 0000-0003-0829-5213, vs1969r@mail.ru

#### Authors

**Vladimir S. Sibirtsev** – PhD, Associate Professor, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, Scopus ID: 6603964394, ORCID ID: 0000-0003-0829-5213, vs1969r@mail.ru