

## ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА $\text{Ca}^{2+}$ -РАЗРЯЖЕННОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

Петрова А. С., Алиева Р.Р.,

научный руководитель канд. физ.-мат. наук Белогурова Н. В.

*Сибирский Федеральный Университет*

$\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопротеин Обелин ответственен за биолюминесценцию гидроидного полипа *Obelia longissima*. Молекула фотопротеина представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апопротеина – односубъединичного полипептида (~22 кДа) и «преактивированного» кислородом субстрата – 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком внутри гидрофобной полости, недоступной для растворителя. При связывании ионов кальция фотопротеин подвергается конформационному изменению, происходит реакция внутримолекулярного окислительного декарбоксилирования, продуктами которой являются  $\text{CO}_2$  и целентерамид в возбужденном состоянии, релаксация которого сопровождается излучением кванта видимого света. Продукт биолюминесцентной реакции – комплекс апопротеина с целентерамидом – является флуоресцентным белком, его принято называть разряженным обелином. Благодаря стабильности и нетоксичности разряженный обелин может быть использован как флуоресцентный маркер и индикатор ионов кальция [1] в биологических и медицинских исследованиях. Получены высокоактивные конъюгаты обелина с биоспецифичными молекулами – гаптенами, авидином или стрептавидином, иммуноглобулинами, пригодные для использования в качестве высокочувствительных репортеров в биолюминесцентном микроанализе. Экспериментально обоснована перспективность применения полученных конъюгатов для биолюминесцентного иммуноанализа на примере определения ряда биологически активных веществ – гормонов, онкомаркеров, инфекционных агентов в сыворотках. Показано, что конъюгаты обелин-авидин (или стрептавидин) являются высокочувствительными и быстрыми репортерами для определения биотинилированных олигонуклеотидов в гибридационном анализе продуктов ПЦР [2, 3]. Учитывая такой широкий спектр возможного применения обелина, вызывает интерес зависимость фотолюминесцентных свойств разряженного обелина, от концентрации ряда биомедицинских агентов, которые широко используются в медицинских и биологических исследованиях. Таким образом, целью работы было выявить закономерности влияния на флуоресцентные свойства разряженного обелина распространенных биомедицинских агентов глицерина, этанола, диметилсульфоксида (ДМСО) и полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Были изучены спектры флуоресценции разряженного обелина при различных концентрациях глицерина (0,06 – 0,36 М), этанола (0,01 – 1,18 М) [4], ДМСО (0,002 – 2,65 М) и ПЭГ ( $2 \cdot 10^{-5}$  – 0,042 М). В качестве примера на рисунке 1 представлены спектры испускания разряженного обелина при варьировании концентрации глицерина. При возбуждении 280 нм сложный спектр испускания разряженного обелина представлен излучением триптофанов ( $\lambda_{\text{max}}=345$  нм), целентерамида ( $\lambda_{\text{max}}=503$  нм) и триптофанового эксиплекса ( $\lambda_{\text{max}}=660$  нм). Из рисунка видно, что при увеличении концентрации глицерина, происходит рост интенсивности излучения триптофанов и эксиплекса, и спад интенсивности излучения целентерамида. Подобная картина наблюдалась, также, при варьировании концентрации этанола и ДМСО. В то время как

в случае с ПЭГ напротив наблюдался рост интенсивности излучения целентерамида на 20%.

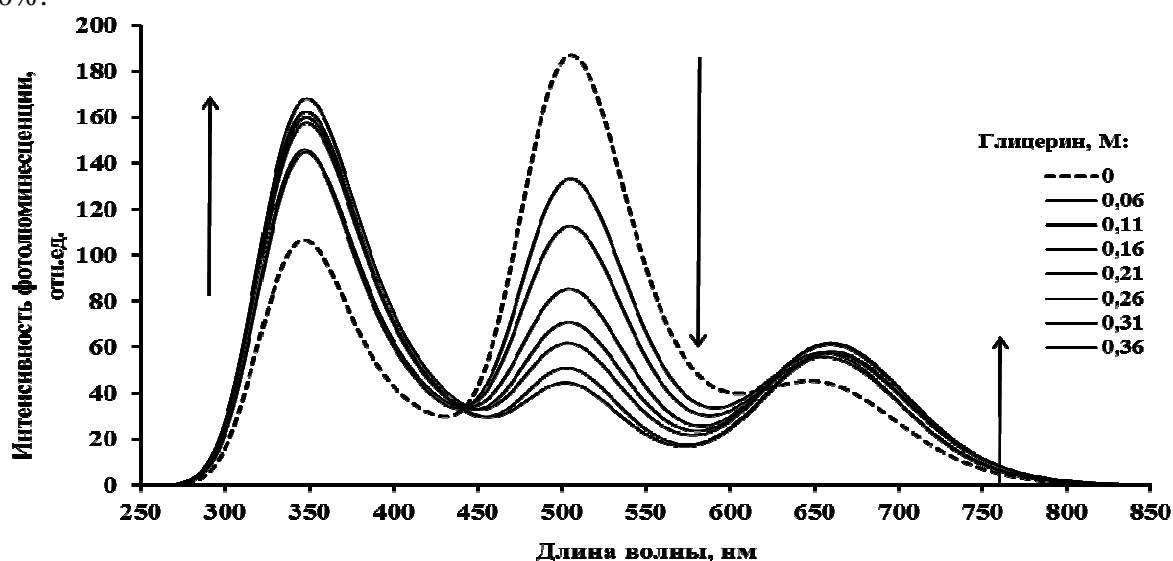


Рисунок 1 – Спектры испускания разряженного обелина ( $\lambda_{\text{exc}}=280$  нм) при варьировании концентрации глицерина

На рисунке 2 представлены нормированные спектры испускания целентерамида (в составе разряженного обелина) в отсутствии и присутствии агентов. Спектры различаются интенсивностью коротковолнового плеча при 420 нм, в случае с глицерином плечо наиболее выражено. Из рисунка 2 видно, что спектры испускания разряженного обелина являются сложными и представляют собой суперпозицию нескольких спектров, каждый из которых можно соотнести с излучателем определенной структуры.

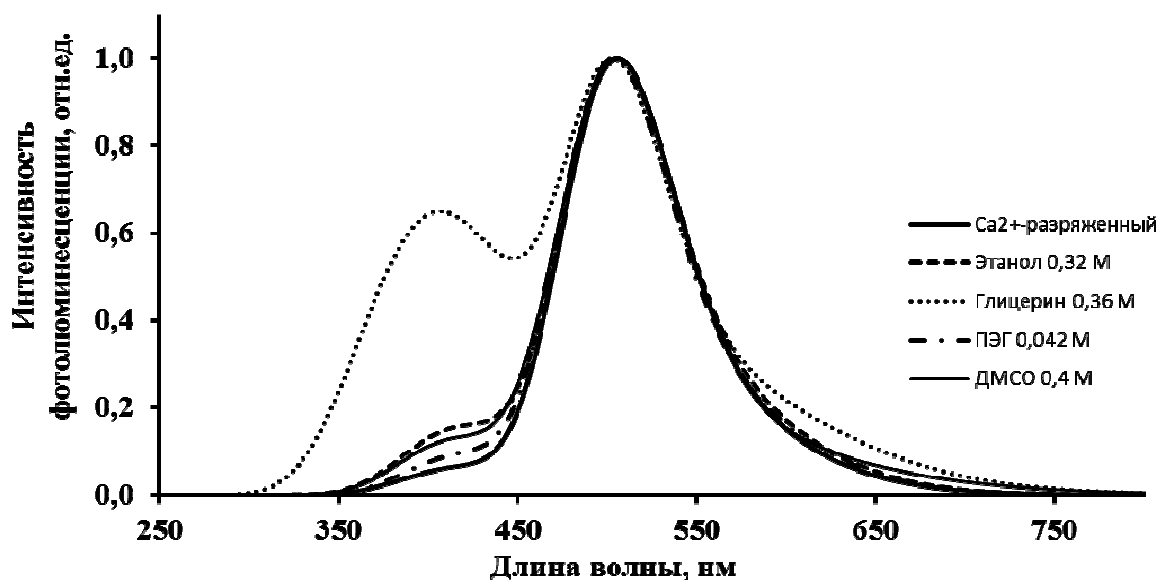


Рисунок 2 – Нормированные спектры испускания разряженного обелина в отсутствии и присутствии агентов ( $\lambda_{\text{exc}}=350$  нм)

Все полученные спектры были разложены на контуры, имеющие гауссово распределение (рис. 3). Для нахождения количества максимумов спектральных компонентов и их положения использовали метод второй производной. Установлено, что спектр испускания ( $\lambda_{\text{exc}} = 350$  нм) является суперпозицией трех контуров (рис. 3).

Опираясь на литературные данные, выделенные контуры были соотнесены различным флуоресцентным формам целентерамида: протонированной (контур I), частично протонированной (контур II) и депротонированной (контур III) формам с максимумами при 420, 503 и 565 нм соответственно. Также были рассчитаны вклады контуров в общий спектр испускания. При добавлении глицерина, этанола и ДМСО вклады контуров изменялись в сторону увеличения испускания протонированной формы целентерамида. Вероятно, это связано с уменьшением эффективности переноса протона в активном центре вследствие расшатывания структуры и разрушения водородных связей в активном центре фотопротеина под воздействием глицерина, этанола и ДМСО. Следует отметить, что добавление ПЭГ к разряженному обелину не вызывало перераспределения контуров.

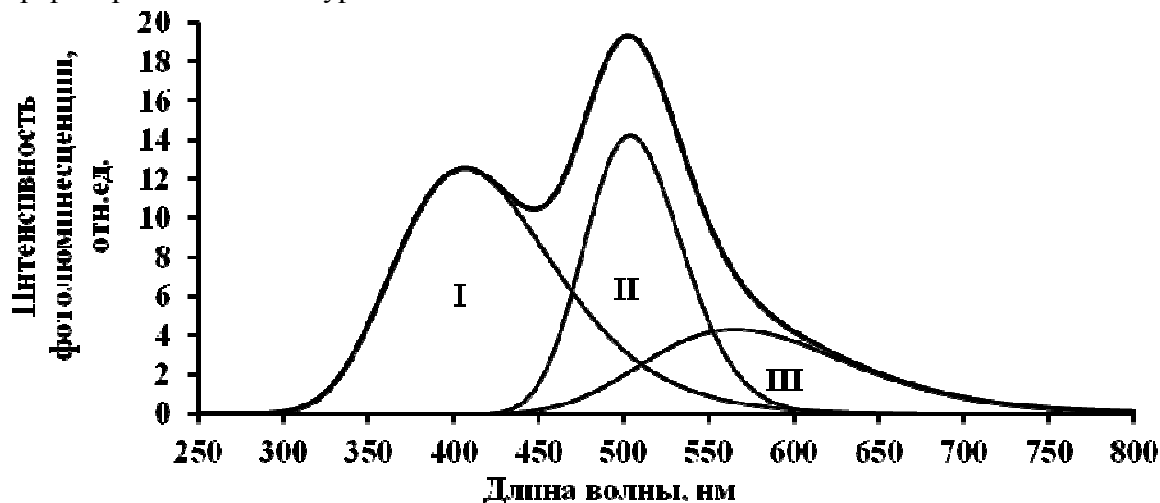


Рисунок 2 – Нормированные спектры испускания разряженного обелина в отсутствии и присутствии агентов ( $\lambda_{\text{exc}}=350$  нм)

Таким образом, добавление различных концентраций биомедицинских агентов вызывало изменение спектральных характеристик флуоресценции (интенсивность и цвет свечения) разряженного обелина. Длина волны возбуждения также влияет на спектральный состав испускания разряженного обелина. Это следует учитывать при использовании разряженного обелина в качестве флуоресцентной метки в биологических и медицинских исследованиях, которые проводятся в присутствии различных биомедицинских агентов. Рассчитаны коэффициенты распада разряженного обелина под воздействием глицерина, этанола и ДМСО. Следует отметить, что ПЭГ, в отличие от других агентов, оказывал стабилизирующее действие на фотопроtein. Показано влияние глицерина, этанола и ДМСО на эффективность переноса протона от целентерамида на протонно-акцепторную группу аминокислотного окружения в активном центре фотопротеина.

- [1] Belogurova N. V. Discharged photoprotein obelin: fluorescence peculiarities / N. V. Belogurova, N. S. Kudryasheva // *Photochem. Photobiol.* – 2010. – 101, P. 103–108.
- [2] Frank L. A.  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters / L. A. Frank // *Sensors*. – 2010. – 10, P. 11287–11300.
- [3] Красицкая В. В. Выявление аллельных вариантов гена с помощью биолюминесцентных репортеров / В. В. Красицкая, Л. П. Буракова, И. А. Пышная, Л. А. Франк // *Биоорганическая химия*. – 2012. – 38(3), С. 342–350.
- [4] Alieva R. R. Effects of alcohols on fluorescence intensity and color of a discharged-obelin-based biomarker / R. R. Alieva, N. V. Belogurova, A. S. Petrova, N. S. Kudryasheva // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. DOI: 10.1007/s00216-014-7685-z