

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.322: [546.26: 553.9]: 543.424.2

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ БИОКОНЬЮГАТОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И ШУНГИТОВОГО НАНОУГЛЕРОДА

А. С. Горюнов¹, А. Г. Борисова¹, В. А. Колодей², С. П. Рожков¹

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Институт геологии Карельского научного центра РАН

Получен спектр комбинационного рассеяния биоконъюгата белка – сывороточного альбумина быка с шунгитовым нанокуглеродом в водной нанодисперсии. Сравнение спектра со спектрами компонентов биоконъюгата свидетельствует об изменениях во вторичной структуре белка, связанных с ослаблением образуемых аминокислотными остатками тирозина водородных связей.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, шунгитовый нанокуглерод, спектроскопия комбинационного рассеяния, биоконъюгат, наночастица.

A. S. Goryunov, A. G. Borisova, V. A. Kolodey, S. P. Rozhkov. RAMAN SPECTROSCOPY OF BIOCONJUGATES OF BOVINE SERUM ALBUMIN AND SHUNGITE NANOCARBON

The Raman spectrum of the bioconjugate of protein – bovine serum albumin with shungite nanocarbon in aqueous nanodispersion has been obtained. Comparison of the spectrum with the spectra of the bioconjugate components indicates that the protein secondary structure is altered due to the weakening of hydrogen bonds formed by tyrosine amino acid residues.

Key words: bovine serum albumin, shungite nanocarbon, Raman spectroscopy, bioconjugate, nanoparticle.

Введение

Формирование комплексов белковых молекул с наночастицами открывает возможности для создания гибридных систем, функции которых смогут иметь разнообразные биотехно-

логические, химикотехнологические и медицинские приложения. Получение комплексов такого рода сопряжено с необходимостью контролировать и поддерживать компоненты в функционально активном структурном состоянии. Поэтому изучение взаимодействий между

наночастицей и белковой молекулой при их контакте в составе комплекса (биоконъюгата) представляет собой весьма важную задачу. Такая конъюгация часто приводит к модификации как структуры, так и функции белка, а иногда и свойств наночастицы [Aubin-Tam, Hamad-Shifferli, 2008]. Цель настоящей работы – установить наличие и характер изменений структуры молекул белка – сывороточного альбумина при образовании конъюгата с шунгитовым наночуглеродом путем анализа спектров комбинационного рассеяния биоконъюгата и его компонентов. В качестве метода, способного обнаружить изменения в структуре комплекса, использована спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия), которая известна как эффективный неповреждающий подход, дающий детальную информацию на молекулярном уровне, в частности, на уровне вторичной структуры белка.

Материал и методы

Сывороточный альбумин – основной белок плазмы крови. Молекула сывороточного альбумина быка (САБ) представляет собой единую полипептидную цепь из 585 аминокислотных остатков, сложенную в виде ряда петель, организованных в три гибко связанных домена, каждый из которых состоит из трех субдоменов; молекулярный вес около 66,5 кДа. Размеры белковой глобулы 14×4×4 нм. В цепи много заряженных и ароматических остатков (30 фенилаланинов и 21 тирозин), 5 метионинов и 35 полуцистеинов, которые образуют 17 дисульфидных мостиков. Эти дисульфидные связи определяют вторичную структуру молекулы альбумина, которую на 50–68 % составляют α -спирали и на 16–18 % – β -складки [Petitpas et al., 2001].

Шунгитовый наночуглерод в водной дисперсии представлен наночастицами (90–100 нм), сформированными из многослойных наноглобул <10 нм, которые в свою очередь образованы базовыми структурными элементами – непланарными графеновыми фрагментами размером <1 нм. Фрагменты являются стабилизаторами наноглобул в водной среде [Рожкова, 2011]. Водные нанодисперсии шунгитового углерода были получены по методике, описанной ранее в работах [Рожков и др., 2007; Rozhkova et al., 2007; Рожкова, 2011].

Сывороточный альбумин быка (САБ, V фракция, ПанЭко), растворенный в воде, использовали в эксперименте без дальнейшей очистки. Для получения биоконъюгатов белка с наноча-

стицами шунгитового углерода в нанодисперсию углерода вводили белковый раствор высокой начальной концентрации. В результате дисперсия содержала белок и наночуглерод в концентрациях 20 и 0,05 мг/мл, соответственно. Образование биоконъюгатов контролировалось с помощью спектроскопии динамического светорассеяния на анализаторе размеров наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). При указанном соотношении концентраций компонентов некоторая часть белка находилась в свободном состоянии в растворе. Полученное распределение биоконъюгатов по размерам имело максимум при 200 нм и ширину 300 нм.

Регистрация спектров комбинационного рассеяния света (КРС) производилась на рамановском дисперсионном спектрометре Nicolet Omega XR (Thermo Scientific). При этом использовался ИК-лазер с длиной волны излучения 785 нм; спектральное разрешение прибора 1 см⁻¹, мощность возбуждающего лазера 300 мВт. Спектры регистрировались с 15-минутным накоплением. Растворы помещались в кварцевую кювету, которую устанавливали в отделении для макрообразцов перпендикулярно оси лазерного пучка.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведен спектр КРС водной нанодисперсии шунгитового углерода в интервале волновых чисел 700–1800 см⁻¹. Известно, что в спектрах КР аморфного углерода наблюдаются, как правило, две полосы – G(graphite)-полоса с волновым числом (частотой) около 1560 см⁻¹ и D(diamond)-полоса с частотой около 1350 см⁻¹, обусловленные sp^2 -связями [Ferrari, Robertson, 2000]. G-полоса обусловлена растяжением пар sp^2 -связей в углеродных кольцах и цепях, а D-полоса – «дышащими» модами в углеродных цепях. Интенсивность полосы D является в известной степени мерой беспорядка структуры (вернее, структурной неупорядоченности углерода) [Сморгонская, Иванов-Омский, 2005; Ременюк и др., 2009]. Для порошка шунгита эти полосы наблюдаются на 1590 см⁻¹ и 1345 см⁻¹, соответственно, т. е. имеет место так называемый «синий сдвиг» для G-полосы и «красный» сдвиг для D-полосы. На спектре водной нанодисперсии шунгитового углерода наиболее интенсивными также являются G- и D-полосы, характерные для углеродных структур, но еще более сдвинутые друг от друга, 1605 см⁻¹ и 1318 см⁻¹, соответственно, причем как интенсивность, так и ширина полосы D несколько больше, чем G-полосы. Полу-

ширина ($\Delta\nu_{1/2}$) полосы D составляет 104 см^{-1} , а полосы G – 70 см^{-1} . Кроме того, наблюдается небольшой пик около 1460 см^{-1} , который проявляется в спектрах КР нанокристалличе-

ских алмазов; его принято соотносить с сильно разупорядоченными кластерами sp^3 -связанного углерода [Ferrari, Robertson, 2001].

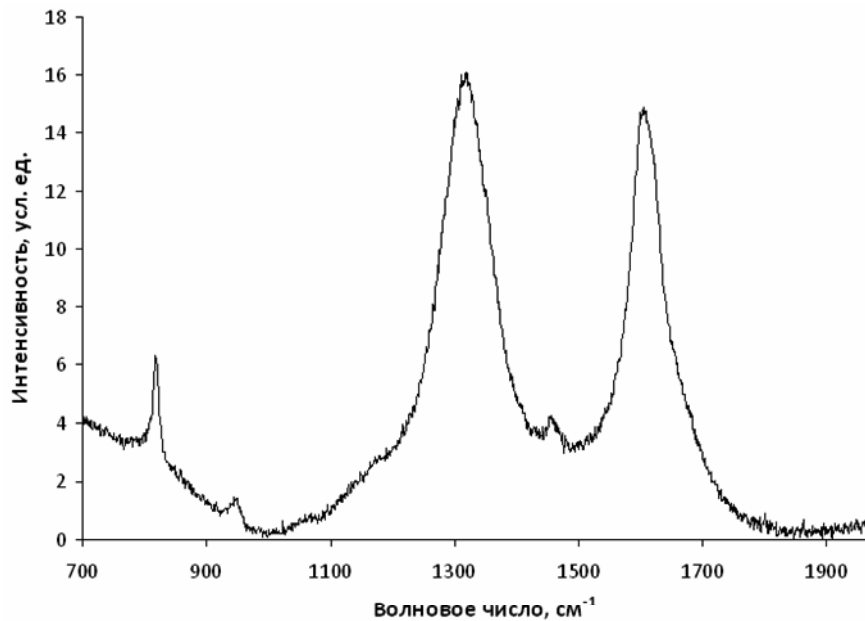


Рис. 1. Спектр комбинационного рассеяния нанодисперсии шунгитового углерода; концентрация углерода 0,1 мг/мл

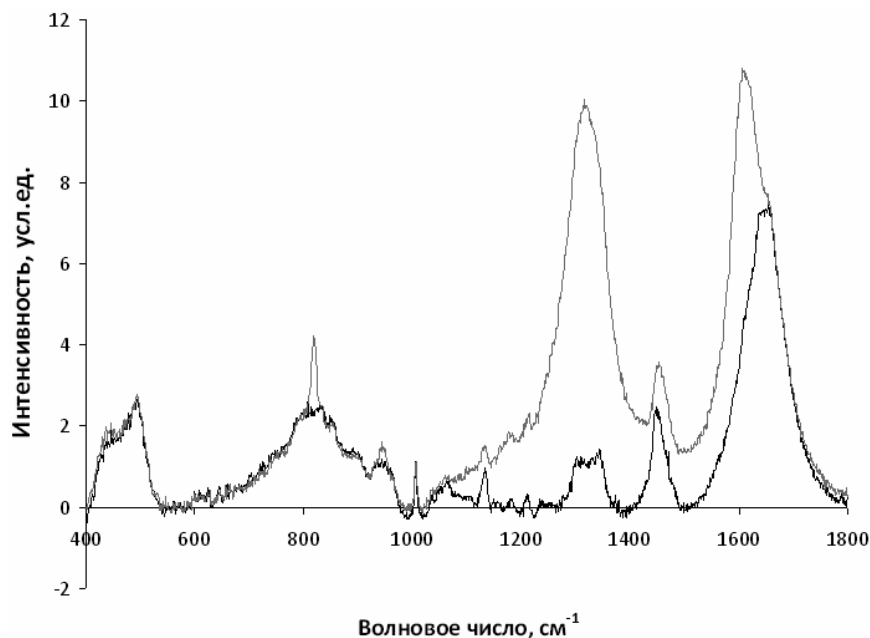


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния водного раствора сывороточного альбумина быка, концентрация 20 мг/мл (черная линия); водной нанодисперсии био-конъюгата сывороточный альбумин быка – шунгитовый наноуглерод, концентрация по белку 20 мг/мл, по углероду – 0,05 мг/мл (серая линия)

Спектр нативного сывороточного альбумина быка в диапазоне $400\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ представлен на рис. 2. В спектре наблюдается ряд пиков различной ширины и интенсивности. колеба-

ния в области $1400\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ обусловлены, в основном, двумя разновидностями связей: колебания пептидных связей -CO-NH- , формирующих белковую основу, и колебания, связан-

ные с боковыми цепочками аминокислот. В спектрах КР белковых молекул наблюдаются следующие полосы: амид I ($1655\text{--}1675\text{ см}^{-1}$), который представляет собой, главным образом, валентное колебание $\text{C}=\text{O}$; амид II (1560 см^{-1} , деформационное колебание N-H , валентное C-N); амид III ($1240\text{--}1260\text{ см}^{-1}$, валентное C-N , деформационное N-H) [Peticolas, 1995]. Пик 1450 см^{-1} соответствует деформационному крутильному колебанию CH_2 . В спектрах амида I и амида III, используемых для анализа вторичной структуры белка, проявляются колебания основной полипептидной цепи. При этом выделяются следующие характеристические частоты:

– амид I $1645\text{--}1655\text{ см}^{-1}$ (α -спираль), $1670\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ (β -структура) и $1660\text{--}1670\text{ см}^{-1}$ (хаотический клубок, валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ связи);

– амид III $1270\text{--}1280\text{ см}^{-1}$ (α -спираль), $1230\text{--}1240\text{ см}^{-1}$ (β -структура) и $1240\text{--}1260\text{ см}^{-1}$ (хаотический клубок, C-N растяжение, NH поворот) [Peticolas, 1995].

Для раствора САБ в воде наблюдаются полосы амида I: $1638\text{--}1654\text{ см}^{-1}$, 1450 см^{-1} , $1290\text{--}1350\text{ см}^{-1}$ (широкая полоса), острый пик при 1006 см^{-1} (дыхательная мода бензольного кольца фенилаланина) и ряд полос в области $700\text{--}900\text{ см}^{-1}$.

При сравнении спектров (рис. 2) обнаруживается, что интенсивность рассеяния шунгитового наноглерода в водной дисперсии гораздо выше, чем у белка в растворе при используемых в эксперименте концентрациях. Кроме того, в области $1100\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ рассеяние шунгитовой дисперсии полностью перекрывает рассеяние белка, что способно существенно усложнить анализ спектров.

На рис. 2 представлен также спектр биоконъюгата САБ с шунгитовым углеродом в водной нанодисперсии. Самыми интенсивными в этом спектре по-прежнему являются полосы шунгитового углерода – полосы G и D (1606 и 1318 см^{-1} , соответственно). Положение пиков при этом не изменилось, однако возросли их интенсивности за счет вклада белка, кроме того, пик G стал шире $\Delta\nu_{1/2} = 95\text{ см}^{-1}$, а пик D, наоборот, сузился $\Delta\nu_{1/2} = 94\text{ см}^{-1}$. Вклад белка особенно заметен в области полосы амид I, которая на спектре проявляется как плечо на частоте 1654 см^{-1} . Аналогичные спектры были сняты для конъюгатов с различной концентрацией шунгитового углерода (от $0,01$ до $0,05\text{ мг/мл}$).

Отсутствие зависимости положения максимумов полос D и G от содержания сывороточного альбумина в растворе свидетельствует о том, что белок в составе конъюгата не оказы-

вает заметного воздействия на химические связи в углеродной матрице и структуру шунгитового углерода в нанодисперсии.

Для качественной оценки конформационных изменений молекулы белка, в частности, при его частичной или полной денатурации используется полоса амид I, которая, как известно, является индикатором воздействий на вторичную структуру молекул белков и полипептидов. В конъюгатах шунгитового углерода с САБ положение полосы амид I (плечо 1654 см^{-1}) остается неизменным, что отражает тот факт, что преобладающей вторичной структурой во всех образцах по-прежнему является α -спираль.

Для спектра биоконъюгата характерны белковые пики в области $500\text{--}1100\text{ см}^{-1}$, а также малоинтенсивные пики шунгитового наноглерода при 820 и 943 см^{-1} . Перекрывание этих пиков, хотя и частичное, вызывает определенные трудности при анализе спектров. Полосы при 1343 и 890 см^{-1} соответствуют колебаниям ароматических аминокислот САБ, содержащего 3 остатка триптофана, а пики 830 и 850 см^{-1} соотносят с остатками тирозина [Peticolas, 1995]. Этот тирозиновый дублет вызван резонансом между основными модами кольца и обертонами. Соотношение интенсивностей полос при 850 и 830 см^{-1} является конформационно-чувствительным и отражает состояние триптофана. Колебание кольца фенилаланина (дыхательная мода) проявляется достаточно интенсивной полосой при 1006 см^{-1} , поскольку в молекуле белка 30 остатков этой аминокислоты.

При сравнении спектров нативного белка и биоконъюгата видно, что полоса 1343 см^{-1} полностью перекрывается полосой D шунгитового наноглерода. Изменение пика при 890 см^{-1} состоит лишь в некотором снижении его интенсивности, а полоса 1006 см^{-1} остается неизменной, из чего можно сделать вывод, что состояние остатков триптофана и фенилаланина в биоконъюгате сохраняется. Пик при 1315 см^{-1} , отражающий изменения в колебаниях C-H -связей боковых аминокислотных цепей и хорошо заметный в спектре нативного белка, также полностью перекрыт полосой D наноглерода.

Характерный для шунгитового наноглерода слабый пик при 950 см^{-1} совпадает с широким пиком белка $920\text{--}960\text{ см}^{-1}$, поэтому на спектре биоконъюгата наблюдается усиление интенсивности полосы в этой области спектра.

Изменения положения пиков тирозинового дублета в конъюгате также не обнаруживается; однако значения отношения интенсивностей линий тирозинового дублета при 850 и 830 см^{-1} для нативного и конъюгированного белка различаются. Они составили $0,89$ и $0,81$ соответ-

ственно. Уменьшение этого соотношения может отражать ослабление водородных связей, образуемых остатками тирозина с окружающими атомными группами. Вероятно, это происходит за счет взаимодействия с нанougлеродом и, в частности, с его базовыми структурными элементами – непланарными графеновыми фрагментами, поскольку эти структуры имеют дипольный момент, который в разбавленных растворах составляет величину $\mu \cong 6,5 \text{ Д}$.

Таким образом, сравнение спектра биоконъюгата шунгитового нанougлерода с сывороточным альбумином быка в водной нанодисперсии со спектрами компонентов биоконъюгата свидетельствует о том, что структура и свойства белка в присутствии шунгитового нанougлерода претерпевают лишь незначительные изменения. Они относятся ко вторичной структуре белка и связаны с ослаблением образуемых аминокислотными остатками тирозина водородных связей.

Выражаем признательность Н. Н. Рожковой за предоставленные нанодисперсии шунгитового углерода.

Литература

Ременюк А. Д., Звонарева Т. К., Захарова И. Б. и др. Исследование оптических свойств аморфного углерода, модифицированного платиной // Физика

и техника полупроводников. 2009. Т. 43, № 7. С. 947–952.

Рожков С. П., Ковалевский В. В., Рожкова Н. Н. Фуллереносодержащие фазы, получаемые из водных дисперсий наночастиц углерода // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81, № 6. С. 952–958.

Рожкова Н. Н. Нанougлерод шунгитов. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2011. 100 с.

Сморгонская Э. А., Иванов-Омский В. И. Исследование углеродной структуры композитных пленок $\alpha\text{-C:H<Cu>}$ и $\alpha\text{-C:H<Co>}$ методом рамановской спектроскопии // Физика и техника полупроводников. 2005. Т. 39, № 8. С. 970–975.

Aubin-Tam M. E., Hamad-Schifferli K. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates // Biomed Mater. 2008. Vol. 3, N 3. P. 034001.

Ferrari A. C., Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // Physical Review. B. 2000. Vol. 61, N 20. P. 14095.

Ferrari A. C., Robertson J. Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous and diamond like carbon // Physical Review. B. 2001. Vol. 64, N 7. P. 075414.

Peticolas W. L. Raman Spectroscopy of DNA and Proteins // Methods Enzymol. 1995. Vol. 246. P. 389–416.

Petipas I., Grune T., Bhattacharya A. A., Curry S. J. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids // Mol. Biol. 2001. Vol. 314, N 5. P. 955–960.

Rozhkova N. N., Gribanov A. V., Khodorkovskii M. A. Water mediated modification of structure and physical chemical properties of nanocarbons // Diamond and Related Materials. 2007. Vol. 16. P. 2104–2108.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф.-м. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Борисова Александра Григорьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: borisova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Колодей Владимир Александрович

физик
Институт геологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: geology@krc.karelia.ru

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Borisova, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: borisova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Kolodey, Vladimir

Institute of Geology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: geology@krc.karelia.ru

Rozhkov, Sergey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810