

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОКОНЬЮГАТОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА И ШУНГИТОВОГО НАНОУГЛЕРОДА

Горюнов А.С.<sup>1</sup>, Борисова А.Г.<sup>1</sup>, Колодей В.А.<sup>2</sup>, Рожков С.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия, [borisova@krc.karelia.ru](mailto:borisova@krc.karelia.ru)

<sup>2</sup>Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт геологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

Формирование комплексов белковых молекул с наночастицами открывает возможности для создания гибридных систем, которые смогут иметь разнообразные биотехнологические и медицинские приложения. Изучение взаимодействий между наночастицей и белковой молекулой в составе комплекса представляет собой весьма важную задачу, поскольку такая конъюгация часто приводит к модификации как структуры, так и функции белка, а иногда и свойств наночастицы [1]. Целью работы являлось установить наличие и характер изменений структуры молекул сывoroточного альбумина при образовании конъюгата с шунгитовым нанoуглеродом путем анализа спектров комбинационного рассеяния.

Сывороточный альбумин быка (САБ, V фракция, ПанЭко) использовали в эксперименте без дальнейшей очистки. Водные нанодисперсии шунгитового углерода (ШУ) были получены по методике, описанной ранее [2]. ШУ в водной дисперсии представлен наночастицами 90-100 нм, сформированными из многослойных наноглобул размерами <10 нм, которые в свою очередь образованы базовыми структурными элементами - непланарными графеновыми фрагментами размером <1 нм. Фрагменты являются стабилизаторами наноглобул в водной среде [2].

Образование биоконъюгатов контролировалось с помощью спектроскопии динамического светорассеяния на анализаторе размеров наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). При соотношении концентраций компонентов САБ:ШУ = 400:1 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 (КР) производилась на рамановском дисперсионном спектрометре Nicolet Almega XR (Thermo Scientific). При этом использовался ИК-лазер с длиной волны

излучения 785 нм мощностью 300 mW. Спектры регистрировались с 15 минутным накоплением.

На рис. А приведен спектр КР водной нанодисперсии ШУ. Известно, что в спектрах КР аморфного углерода наблюдаются как правило две полосы – G(graphite)-полоса с волновым числом около  $1560\text{ см}^{-1}$  и D(diamond)-полоса с частотой около  $1350\text{ см}^{-1}$ , обусловленные  $sp^2$ -связями [3]. На спектре нанодисперсии ШУ наиболее интенсивными также являются G- и D-полосы, характерные для углеродных структур,  $1605\text{ см}^{-1}$  и  $1318\text{ см}^{-1}$ , соответственно.

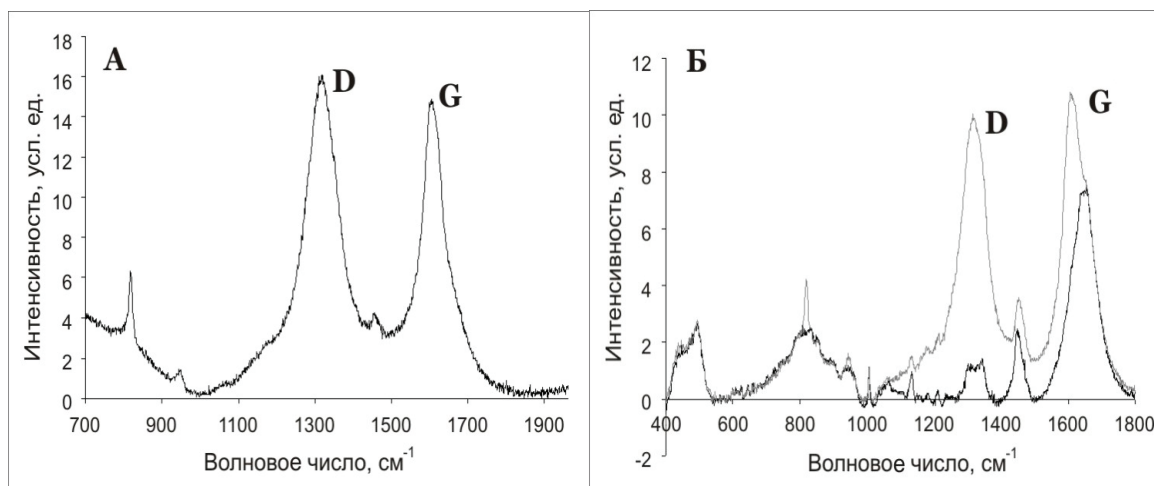


Рисунок – Спектры КР: ШК, концентрация 0,1 мг/мл (А); САБ, концентрация 20 мг/мл (черная линия, Б) и конъюгата САБ - ШК, САБ 20 мг/мл, ШК – 0,05 мг/мл (серая линия, Б)

Спектры нативного САБ и биоконъюгата в водной нанодисперсии представлены на рис. Б. Перекрытие пиков ШУ и белка вызывает определенные трудности при анализе спектров. Самыми интенсивными в этом спектре по-прежнему являются полосы ШУ – полосы G и D,  $1606$  и  $1318\text{ см}^{-1}$ , соответственно. Положение пиков не изменилось, однако возросли их интенсивности за счет вклада белка, кроме того, пик G стал шире, а пик D, наоборот, сузился. Вклад белка особенно заметен в области полосы амид I, которая на спектре проявляется как плечо на частоте  $1654\text{ см}^{-1}$ . Аналогичные спектры были сняты для конъюгатов с различной концентрацией ШУ (от 0,01 до 0,05 мг/мл).

Отсутствие зависимости положения максимумов полос D и G от содержания САБ в растворе свидетельствует о том, что белок в составе конъюгата не оказывает заметного воздействия на химические связи в углеродной матрице и структуру ШУ в нанодисперсии. В конъюгатах

ШУ с САБ положение полосы амид I (плечо  $1654\text{ см}^{-1}$ ) остается неизменным, что отражает тот факт, что преобладающей вторичной структурой во всех образцах по-прежнему является  $\alpha$ -спираль. Колебание кольца фенилаланина (дыхательная мода) проявляется как полоса  $1006\text{ см}^{-1}$ . Пики  $830$  и  $850\text{ см}^{-1}$  соотносят с остатками тирозина, соотношение их интенсивностей  $R_{850/830}$  является конформационно-чувствительным и отражает состояние триптофана.

Изменения положения пиков тирозинового дублета в конъюгате также не обнаруживается; однако значения отношения интенсивностей линий тирозинового дублета  $R_{850/830}$  для нативного и конъюгированного белка различаются - они составили  $0,89$  и  $0,81$ , соответственно. Уменьшение этого соотношения может отражать ослабление водородных связей, образуемых остатками тирозина, с окружающими атомными группами. Вероятно, это происходит за счет взаимодействия с нанокуглеродом, и в частности, с его базовыми структурными элементами - неплоскими графеновыми фрагментами, поскольку эти структуры несут дипольный момент, который в разбавленных растворах имеет величину  $\mu \cong 6,5\text{ D}$ .

Таким образом, сравнение спектра биоконъюгата ШУ с САБ в водной нанодисперсии со спектрами компонентов биоконъюгата свидетельствует о том, что структура и свойства белка претерпевают лишь незначительные изменения, связанные с ослаблением образуемых аминокислотными остатками тирозина водородных связей.

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

### Литература

1. Aubin-Tam M. E., Hamad-Schifferli K. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates // *Biomed Mater.* - 2008. - Vol. 3, N 3. - P.034001.
2. Рожкова Н. Н. Нанокуглерод шунгитов. - Петрозаводск: Карельский НЦ РАН., 2011. - 100 с.
3. Ferrari A. C., Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // *Physical Review. B.* - 2000. -Vol. 61, N 20. - P.14095.