

УДК 535.37+543.545.2

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МЕТОДИКА АНАЛИЗА ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕГРАМ СО СПЕКТРАЛЬНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

Д.С. ТАРАСОВ^{1,2}, М.П. САМЦОВ¹, Е.В. МАЛЮШКОВА¹, И.И. ХЛУДЕЕВ², И.В. СЕМАК²

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ (Минск, Беларусь)

²Белорусский государственный университет (Минск, Беларусь)

Аннотация. В работе предложен макет сканирующего лазерного устройства с высоким спектральным разрешением для детектирования флуоресцирующих белков на электрофореграммах. Его конструкция основана на перемещаемой микрометрическими винтами платформы, на которой перпендикулярно исследуемой плоскости закреплен держатель световода лазерного флуоресцентного спектрометра. Устройство разрабатывалось для анализа связывания трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови с помощью электрофореза белков (метод Лэммли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях). Для возбуждения флуоресценции использован лазер с длиной волны 684 нм. Подвод возбуждающего излучения к исследуемому образцу и свечения флуоресценции в полихроматор осуществлялся с помощью оптоволоконка. Показано, что регистрация спектров флуоресценции дает дополнительную информации для идентификации флуоресцентной метки и анализа ее состояния. На примере исследования с помощью гель-электрофореза окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов бычьего сывороточного альбумина показана возможность обнаружения комплексов флуорофоров с белковыми молекулами.

Ключевые слова: трикарбоцианиновые красители, комплексобразование, белки плазмы крови, гель-электрофорез, лазерная флуоресцентная спектроскопия.

FLUORESCENT METHOD FOR ANALYSIS OF ELECTROPHOREGRAMS WITH SPECTRAL RESOLUTION

DMITRI S. TARASAU^{1,2}, MICHAEL P. SAMTSOV¹, ELENA V. MALIUSHKOVA²,
IVAN I. KHLUDEEV², IGOR V. SEMAK²

¹A.N Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of BSU (Minsk, Belarus)

²Belarussian State University (Minsk, Belarus)

Abstract. The paper proposed model of the scanning laser device with high spectral resolution for detecting fluorescent proteins on electrophoregrams. Its design is based on the movable by micrometric screws platform, on which the holder of the optical fiber of the laser fluorescence spectrometer is fixed perpendicular to the plane under study. The device was developed to analyze the binding of tricarboyanine dyes to blood plasma proteins using protein electrophoresis (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, Laemmli method). A laser with a wavelength of 684 nm was used to excite fluorescence. The supply of exciting radiation to the sample under study and the fluorescence into the polychromator was carried out using an optical fiber. It is shown that the fluorescence spectra registration provides additional information for the identification of the fluorescent label and analyze its condition. On the example of a study using gel electrophoresis of solutions of bovine serum albumin stained with tricarboyanine dyes, the possibility of detecting and identifying complexes of dyes with blood serum proteins has been shown.

Keywords: tricarboyanine dyes, complexation, blood plasma proteins, gel-electrophoresis, laser-induced fluorescence spectroscopy.

Введение

Гель-электрофорез один из основных инструментов молекулярной биологии и биохимии для разделения и анализа белков. Разделение происходит за счёт разницы скоростей движения анализируемых макромолекул с разным соотношением молекулярной массы к заряду в постоянном электрическом поле. Путем использования флуоресцентных меток становится

возможным определением молекулярной массы белковых макромолекул и их фрагментов. Детектирование осуществляется по специфическому цвету флуоресценции метки.

При этом для обнаружения на электрофореграммах флуоресцирующих белков широкое распространение получила регистрация их изображений с помощью чувствительных CCD-матриц [1]. Как правило, флуоресцентное изображение в интересующем спектральном диапазоне регистрируется при использовании соответствующего набора фильтров. Такой мультиспектральный подход обеспечивает высокое пространственное разрешение при приемлемом уровне чувствительности. В то же время, спектральная селективность составляет от десятков до сотен нанометров. Во многих задачах информация о состоянии метки содержится в ее спектрально-люминесцентных характеристиках, что требует более высокого спектрального разрешения. Решение такой задачи возможно с использованием гиперспектральной аппаратуры, которая позволяет производить сканирование объекта при высоком спектральном разрешении. Для такого рода исследований возможно использовать сканирующую систему на основе платформы с координатным позиционированием световолоконного коллектора, который собирает регистрируемое излучение и доставляет его на вход спектрометра с использованием Y-образного зонда.

В данной работе предложен макет сканирующего устройства со спектральным разрешением для исследования взаимодействия индотрикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови [2].

Методика проведения эксперимента

Основным объектом исследования выступал разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель ПК1 (рис. 1), который по многим параметрам перспективен для использования в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ [3], а также два близких по структуре красителя – ПК2 и ПК3. У первого по сравнению с ПК1 отсутствуют полиэтиленгликоли на концевых группах, а у второго – хлорзамещенный ортофениленовый мостик.

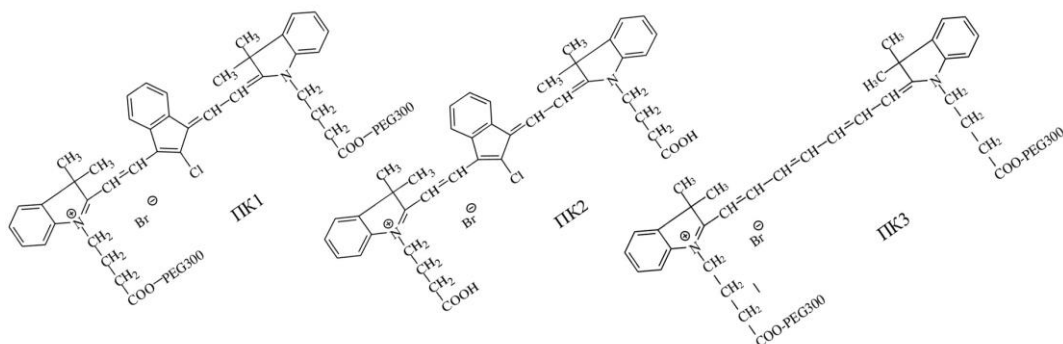


Рис. 1. Структура исследованных индотрикарбоцианиновых красителей

В качестве модельной биологической среды использовался раствор бычьего сывороточного альбумина (концентрация белка 2 г/л). Растворы готовились в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с pH=7,4 (ФСБ). Концентрация белков в анализируемых на электрофорезе образцах составляла 30 мкМ. Стоковые растворы красителей готовились в ФСБ. Краситель ПК2 обладает низкой растворимостью в воде, в связи с чем стоковый раствор для него готовился с 5 % содержанием этанола. Исследования проводились при двух концентрациях красителей – 30 мкМ и 10 мкМ. Исследования на электрофорезе проводились для двух серий образцов: при комнатной температуре (22 °С) и при инкубации в течение 120 минут при 37 °С.

Анализ связывания красителей с белками в растворах БСА выполнялся с помощью электрофореза белков по методу Лэммли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE). Электрофоретическое разделение белков проводили в 15 % полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях. В связи с тем, что на стадии окрашивания используются агрессивные среды, которые приводят к необратимой

деструкции индотрикарбоцианиновых красителей, места локализации красителей на электрофореграмме определяли до начала процедуры окрашивания раствором Кумасси для визуализации полос белков. В обоих случаях координаты фиксировались относительно границ гелей, что позволило совместить распределение белков и индотрикарбоцианиновых красителей на электрофореграмме. После детектирования красителя осуществляли осаждение белков в геле с помощью 30% раствора трихлорукусной кислоты. Далее проводили окрашивание раствором Кумасси. После окрашивания, гель отмывали 7% уксусной кислотой до полного обесцвечивания фона. Имеющееся в распоряжении оборудование позволяет исследовать на одной электрофореграмме до 9 образцов. Для определения молекулярной массы белков в одну из лунок вносили набор белков стандартов с известными молекулярными массами – от 10 кДа до 200 кДа.

Макет сканирующего устройства со спектральным разрешением конструктивно состоит из перемещаемой микрометрическими винтами платформы, на которой перпендикулярно исследуемой плоскости закреплен держатель световода лазерного флуоресцентного спектрометра, в котором для возбуждения флуоресценции использован лазер с длиной волны 684 нм. Подвод возбуждающего излучения к исследуемому образцу и свечения флуоресценции в полихроматор осуществлялся с помощью оптоволокну. Путем перемещения светоколлектора вдоль белковых полос на электрофореграмме по флуоресценции определяли координаты молекул красителей. При этом информационным считался сигнал флуоресценции красителей в случае его устойчивого превышения по сравнению с фоновым. Полученные визуализированные электрофореграммы исследуемых образцов фиксировались с помощью фотоаппарата, и на снимки переносились координаты обнаружения красителей.

Результаты и их обсуждение

Спектральные характеристики красителей в ФСБ определяются процессом агрегации молекул в водном окружении. Краситель ПК2 без ПЭГ является гидрофобным и в водном окружении агрегирует с образованием Н- и J-ассоциатов. В спектрах поглощения его растворов в ФСБ обнаруживаются полосы, соответствующие мономерам, Н- и J-агрегатам (рис. 2а).

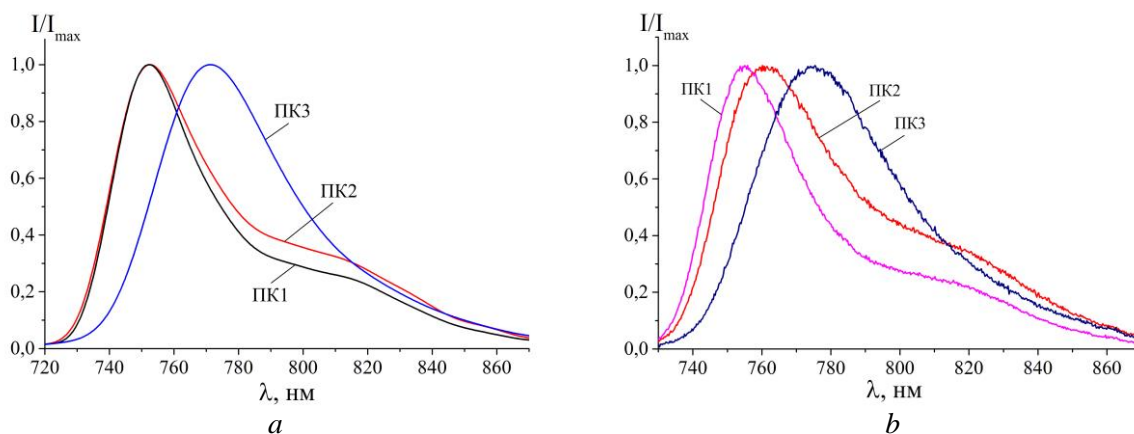


Рис. 2. Нормированные спектры флуоресценции трикарбоцианиновых красителей при возбуждении излучением с длиной волны 684: *a* – в ФСБ, концентрация красителей 10 мкМ; *b* – в растворах БСА в ФСБ, концентрация красителей 30 мкМ

Максимум полосы мономеров располагается вблизи 707 нм. Краситель ПК1 гидрофильный, его растворы в ФСБ представляют собой равновесную смесь мономеров и димеров Н-типа. Максимум поглощения мономеров располагается на длине волны 708 нм. Следует отметить, что при одинаковой концентрации краситель ПК1 в ФСБ агрегирован в меньшей степени по сравнению с его прекурсором без ПЭГ – ПК2. Анализ спектрально-люминесцентных свойств ПК3 в растворах в ФСБ позволяет утверждать, что его молекулы находятся преимущественно в форме мономеров (максимум поглощения – 746 нм).

Спектральные параметры растворов ПК1 и ПК2 в растворах БСА (рис. 2б) резко отличаются от таковых в ФСБ: наблюдается смещение максимума поглощения (ПК1 – 724 нм, ПК2 – 734 нм) и флуоресценции (ПК1 – 755 нм, ПК2 – 761 нм) в длинноволновую область, уменьшается поглощение в полосе агрегатов, возрастает квантовый выход и время жизни флуоресценции. Не обнаружено влияние молекул БСА на спектрально-люминесцентные свойства ПК3, у которого отсутствует хлорзамещенный ортофениленовый мостик на полиметиновой цепи сопряжения.

В результате сканирования лазерным флуоресцентным спектрометром геле-электрофореграммы обнаружено несколько позиций с выраженным сигналом, близким по спектральному составу со спектром флуоресценции исследованных красителей. На фотографиях гелей после окрашивания эти позиции отмечены метками (рис. 3). В пределах полос, соответствующих движению растворов БСА не окрашенных красителями не наблюдается никакого свечения при возбуждении лазером с длиной волны 684 нм.

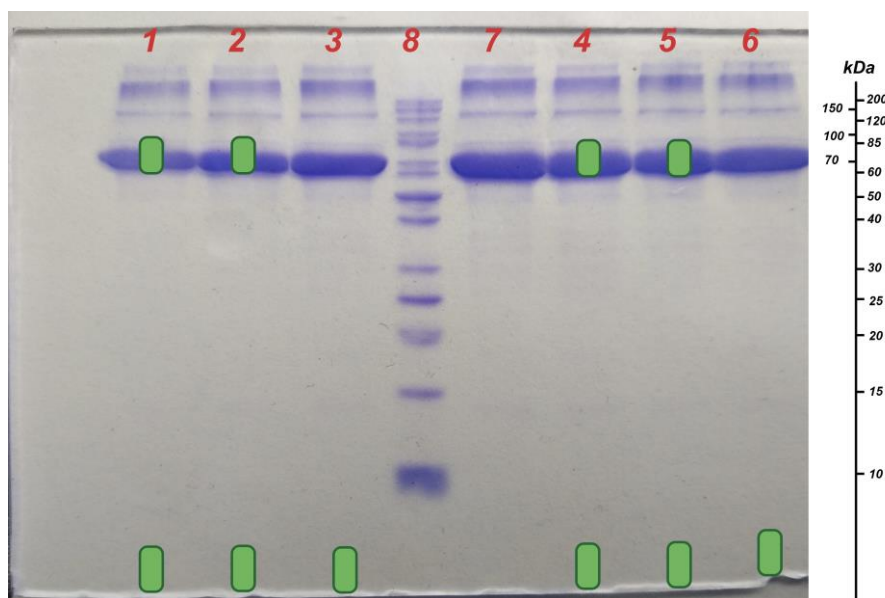


Рис. 3. Электрофореграмма растворов БСА, предварительно обработанных трикарбоцианиновыми красителями: 1 – ПК1, 22 °С; 2 – ПК2, 22 °С; 3 – ПК3, 22 °С; 4 – ПК1, 37 °С; 5 – ПК2, 37 °С; 6 – ПК3, 37 °С; 7 – раствор без красителей; 8 – набор белков стандартов с известными молекулярными массами

Молекулярная масса бычьего сывороточного альбумина – 69 кДа, на электрофореграмме ей соответствует полоса вблизи (72 ± 4) кДа. Здесь наблюдается выраженный сигнал флуоресценции образцов окрашенных красителями ПК1 и ПК2 для обеих серий (рис. 4). Учитывая пространственное разрешение сканирующей системы, можно утверждать, что флуоресценция в данной области соответствует ковалентным комплексам ПК1 и ПК2 с альбумином. Максимум флуоресценции красителей ПК1 и ПК2 в комплексах с альбумином располагается на 754 нм и 762 нм соответственно (рис. 4а), что в пределах погрешности коррелирует со значением данного параметра в исходных растворах красителей в БСА. Это указывает на то, что гель практически не оказывает влияние на спектры флуоресценции молекул красителя.

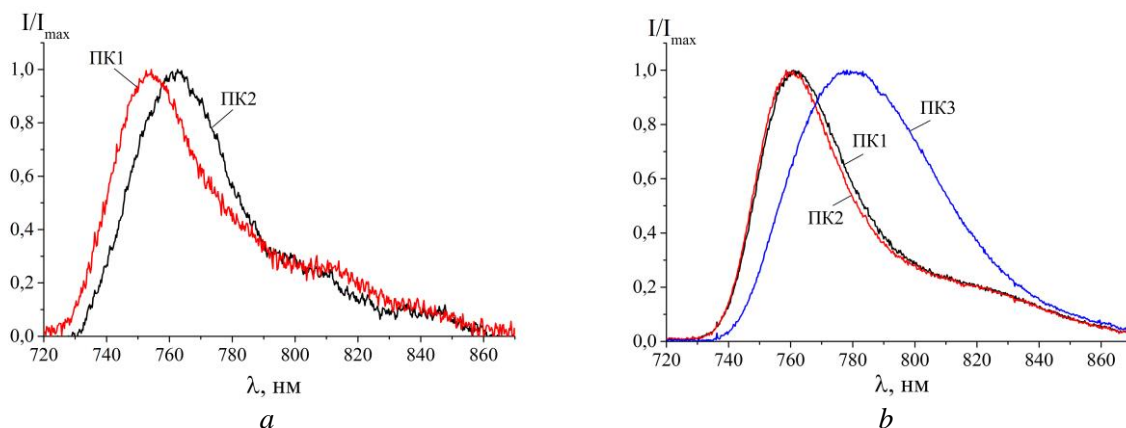


Рис. 4. Нормированные спектры флуоресценции комплексов трикарбоцианиновых красителей с альбумином на электрофореграмме (а) и несвязанных с белками трикарбоцианиновых красителей (b) при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм

Для всех красителей обнаружен интенсивный сигнал флуоресценции на нижнем краю геля. Согласно экстраполяции стандарта, молекулярная масса объектов в этой области, соответствует приблизительно 1,5-6,0 кДа. При этом после окрашивания геля здесь не обнаруживаются визуально присутствие каких-либо белков. Молекулярная масса исследованных красителей: ПК1 – 1270 Да, ПК2 – 740 Да, ПК3 – 1117 Да. Учитывая точность определения координаты, справедливо утверждать, что в данной области обнаруживается несвязанные с белками красители. Происходит батохромное смещение максимумов спектров флуоресценции на ~8 нм по сравнению со спектрами красителей в ФСБ (рис. 4б). Такое же смещение наблюдается при капельном нанесении растворов красителей в ФСБ на поверхность чистого геля. Разумно предположить, что в геле краситель переходит в окружение с более низкой полярностью по сравнению раствором ФСБ.

Заключение

В работе предложен макет сканирующего лазерного устройства с высоким спектральным разрешением для детектирования флуоресцирующих белков на электрофореграммах. Показано, что регистрация спектров флуоресценции дает дополнительную информацию для идентификации флуоресцентной метки и анализа ее состояния. На примере исследования с помощью гель-электрофореза окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов бычьего сывороточного альбумина показана возможность обнаружения комплексов флуорофоров с белковыми молекулами.

Список литературы

1. Patton W.F. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis: An International Journal*. 2000;21(6):1123–1144.
2. Самцов М.П., Тарасов Д.С., Малюшкова Е.В. и др. Анализ свойств комплексов полиметиновых красителей с белками сыворотки крови методом гель-электрофореза. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2021;6(3):499-504.
3. Lugovski A.A, Samtsov M.P., Kaplevsky K.N., et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016;316:31-36.