



ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
Россия, Москва, 123557,
Большой Тишинский пер.38
Тел: +7 (495) 605 3507, 605 3610
Факс: +7 (495) 518 9452
info@lab-test.ru, www.lab-test.ru



Применение спектрофлуориметра ChronosDFD с цифровой обработкой сигнала в частотной области (ISS, США) в биохимических исследованиях.

Аннотация статьи:

GRAPHENE OXIDE AS A QUENCHER FOR FLUORESCENT ASSAY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES, AND PROTEINS

Shanghao Li, Ashish N. Aphale, Isaac G. Macwan, Prabir K. Patra, Walter G. Gonzalez, Jaroslava Miksovska, Roger M. Leblanc.

ACS Appl. Mater. Interfaces, 2012, 4 (12), pp 7069–7075.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОКСИДА ГРАФЕНА В КАЧЕСТВЕ ГАСИТЕЛЯ В ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Оксид графена (ОГ) представляет собой двумерный углеродный наноматериал толщиной в один атом, поверхность которого модифицирована различными кислород-содержащими функциональными группами (гидроксильными, фенольными, эпоксидными, карбоксильными и др.). Преимущество оксида графена над другими наноматериалами заключается в его уникальных свойствах, таких как большая удельная поверхность, высокая физсорбция, высокая степень дисперсности в воде и биосовместимость.

Функциональные группы на поверхности оксида графена позволяют образовывать электростатические, гидрофобные и водородные связи, а также участвовать в ароматических взаимодействиях (π - π), которые обычно характерны для малорастворимых в воде соединений. Модифицированный полиэтиленгликолем (ПЭГ) оксид графена может эффективно связывать различные гидрофобные соединения, в том числе и лекарственные препараты. Это может быть использовано в различных биологических и биомедицинских приложениях, включающих адресную доставку лекарств и генов, разработку биосенсоров и т.п.. Ковалентное связывание графена с хитозаном, жирными кислотами и поли-(N-изопропиламидом) может быть использовано для адресной доставки лекарств с контролируемым (термо- или pH-чувствительным) высвобождением. В некоторых исследованиях показано, что на поверхности оксида графена возможна также адсорбция одонитевых молекул ДНК. Двунитевые молекулы ДНК не адсорбируются на поверхности ОГ по причине низкой афинности к оксиду графена. Это свойство также может быть использовано в адресной доставке генов, а также в исследованиях ДНК. Помимо адресной доставки лекарств ОГ может найти применение в качестве фотосенсибилизатора в фототермической терапии при лечении раковых заболеваний или болезни Альцгеймера.

Вышеперечисленные примеры показывают, насколько актуальным остаётся исследование влияния ОГ на структуру биологических макромолекул, таких как аминокислоты, пептиды и белки, но эта область остаётся малоисследованной. Известно, что адсорбция аминокислот, таких как аргинин, гистидин, лизин, триптофан, тирозин и фенилаланин, на поверхности ОГ происходит за счёт электростатических или ароматических (π - π) взаимодействий. Известно также, что оксид графена гасит флуоресценцию меченых пептидов, предположительно, за счёт передачи части энергии возбуждения поверхности оксида графена по механизму Фёрстеровского переноса энергии. Более того, до недавнего времени не было известно о влиянии оксида графена на собственную флуоресценцию аминокислот, пептидов и белков.

Одной из первых работ в этой области стало исследование, проведённое группой американских учёных под руководством Роджера Лебланка из Университета Майями. Целью их работы было изучение влияния, которое оказывает связывание различных биологических молекул с оксидом графена на их флуоресцентные свойства. В качестве объектов исследования учёные выбрали аминокислоты (триптофан и тирозин), пептиды (бета-амилоид 1-40 ($A\beta_{40}$), связанный с болезнью Альцгеймера, и островковый амилоидный пептид диабета II типа (hAPP)) и белки (бычий (BCA) и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА)). Измерения времени жизни флуоресценции проводились с использованием **спектрофлуориметра с разрешением в частотной области ChronosFD (ISS)**. Особенностью данного спектрофлуориметра является технология модуляции возбуждения флуоресценции с использованием различных источников

света и детекторов и последующей цифровой обработкой сигнала. Источники работают с установленной пользователем модуляцией частоты сигнала. Сигнал флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Математическая обработка полученного сигнала позволяет определить амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. По разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции

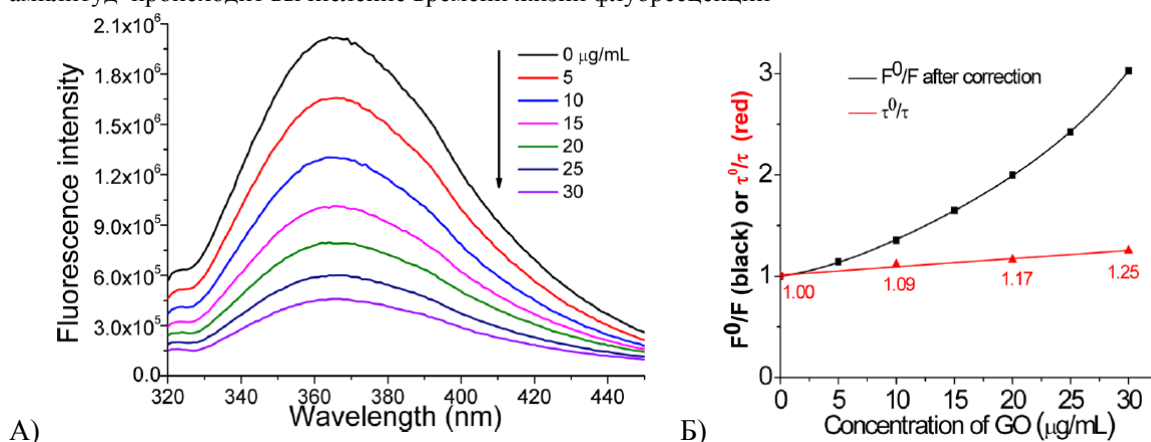


Рис. 1. (А) Гашение флуоресценции 10^{-6} М триптофана в присутствии различных концентраций оксида графена. (Б) Зависимость интенсивности флуоресценции 10^{-6} М триптофана (F^0/F , где F^0 и F – интенсивность флуоресценции в отсутствие и присутствии оксида графена) и времени жизни флуоресценции (τ^0/τ , где τ^0 и τ – время жизни флуоресценции в отсутствие и присутствии оксида графена) от концентрации оксида графена в координатах Штерна-Фольмера.

Исследователи показали, что в присутствии оксида графена происходит снижение интенсивности флуоресценции триптофана (учёные учитывали, что для оксида графена характерно сильное оптическое поглощение в диапазоне 270—360 нм, в котором происходят возбуждение и испускание флуоресценции тирозина и триптофана), при этом вид спектра не менялся. Эффект уменьшения интенсивности флуоресценции в присутствии оксида графена также наблюдался у тирозина, но он был менее ярко выражен. По мнению исследователей, линейная зависимость времени жизни флуоресценции от концентрации оксида графена говорит о том, что часть энергии возбуждения передаётся от молекулы аминокислоты на поверхность ОГ, т.е. реализуется фёрстеровский резонансный перенос энергии. При этом, зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ОГ значительно отличается от зависимости времени жизни флуоресценции, что указывает на это, что фёрстеровский перенос энергии не является единственной причиной гашения флуоресценции, и наблюдается сочетание нескольких механизмов гашения флуоресценции

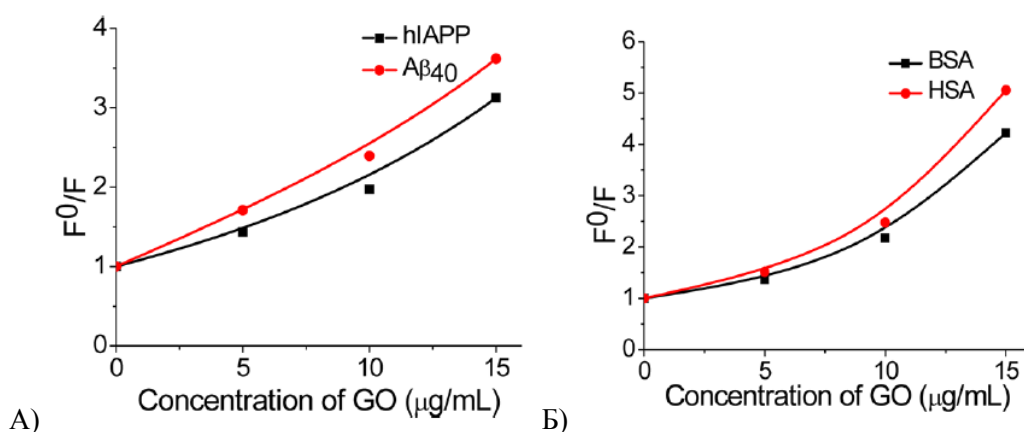


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции (А) 10^{-5} М hIAPP и 10^{-5} М Aβ40, (Б) 10^{-6} М БСА и 10^{-6} М ЧСА от концентрации оксида графена в координатах Штерна-Фольмера.

Для пептидов и белков учёными также было показано уменьшение интенсивности флуоресценции при добавлении оксида графена. Различия в зависимости флуоресценции от оксида графена для двух пептидов, по мнению исследователей, свидетельствуют о различных механизмах связывания аминокислот с поверхностью оксида графена, а для белков эти различия обусловлены преимущественно разным количеством триптофана.

По мнению учёных, проведённое ими исследование показало, что оксид графена является универсальным гасителем флуоресценции триптофана и тирозина, а также содержащих их пептидов и белков.

Подготовил Алексей Шнитко

ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»

тел.: +7 495 605 35 07

факс: +7 495 605 39 44

a.shnitko@lab-test.ru

www.lab-test.ru