

**Е. Ф. Немова, В. И. Федоров**

Институт лазерной физики СО РАН  
просп. Академика Лаврентьева, 13 / 3, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: endy@nsu.ru

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ СПИНОВОГО ЗОНДА**

Исследовано влияние терагерцового излучения на конформационные изменения бычьего сывороточного альбумина, выявляемые методом ЭПР-спектроскопии в присутствии спинового зонда. Показано, что после облучения увеличивается амплитуда и ширина линий триплетного сигнала. Предположено, что эти изменения стерических характеристик реакционных центров отражают конформационные преобразования в молекуле альбумина.

*Ключевые слова:* терагерцовое излучение, субмиллиметровый лазер, транспортные белки, бычий сывороточный альбумин, ЭПР спектроскопия, спиновый зонд.

**E. F. Nemova, V. I. Fedorov**

## **INVESTIGATION OF TERAHERTZ RADIATION EFFECT ON BOVINE SERUM ALBUMIN CONFORMATION DYNAMICS BY SPIN PROBING**

Influence of terahertz radiation on bovine serum albumin conformation was investigated by use of EPR spin probing spectroscopy. It was demonstrated that radiation induces an increase of amplitude and line width of triplet. It is supposed that changes of reaction centers steric characteristics is reflected a conformation transition in albumin molecule.

*Keywords:* Terahertz radiation, submillimeter laser, bovine serum albumin, EPR spectroscopy, spin probing

### **Введение**

Ранее нами и другими исследователями было показано, что при терагерцовом облучении транспортного белка крови альбумина происходят изменения спектральных характеристик [1; 2] и связывающей способности этого белка [2; 3]. В этих работах было предположено, что терагерцовое излучение индуцирует конформационные переходы в молекуле альбумина.

Молекула альбумина представляет собой одну полипептидную цепь, образующую три последовательно расположенных домена. Определённые пространственные сочетания аминокислотных остатков формируют центры связывания, с которыми взаимодействуют лиганды. Степень связывания каждого лиганда меняется в процессе конформационных переходов в молекуле альбумина.

Это обуславливает обратимое связывание лиганда, необходимое для осуществления транспортной функции. Поэтому молекула альбумина является очень удобным объектом для исследования конформационных изменений, вызываемых различными воздействиями.

Для исследования предположения о влиянии терагерцового излучения на конформацию альбумина в настоящей работе применен метод ЭПР-спектроскопии в присутствии спинового зонда. Этот метод является одним из адекватных способов оценки конформационных изменений молекул. В качестве предшественника спинового зонда выбрано соединение дигидропиразин-1,4-диоксид (ДПДО), принадлежащее к классу нитронов (синтезировано в Новосибирском институте органической химии СО РАН). В исходном состоянии оно является

диамагнитным и известно в качестве спиновой ловушки [4].

В данной работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). В водном растворе БСА этот нитрон участвует в химических превращениях, в процессе которых образуется парамагнитное соединение – нитроксильный радикал, дающий спектр ЭПР. Количественные характеристики спектра (амплитуда и ширина линий) связаны со степенью организованности непосредственного окружения парамагнитного центра образовавшегося таким образом спинового зонда – нитроксильной группы.

### Экспериментальная часть

Исследование проводили в пленочных препаратах БСА, которые готовили из раствора белка с концентрацией 1 мг/мл. На подложку из кристаллического кварца наносили 50 мкл раствора и высушивали в потоке воздуха при комнатной температуре.

Облучение БСА проводили на экспериментальном стенде (рис. 1). В качестве источника терагерцового излучения применяли субмиллиметровый лазер с оптической накачкой, детальное описание которого представлено в работе [5].

Облучение проводили на частоте 3,68 ТГц. Средняя мощность лазерного излучения составляла 10 мВт, продолжительность экспозиции 60 мин. После облучения пленку БСА смывали с подложки небольшим количеством дистиллированной воды. Полученный таким образом раствор помещали в стандартную плоскую ампулу для ЭПР-спектроскопии водных растворов, куда добавляли раствор ДПДО до конечной концентрации 7 мМ.

Спектры ЭПР записывали при помощи спектрометра Bruker EMX. Микроволновая мощность не превышала 10 мВт. Амплитуда модуляции составляла 0.3 – 1.0 Гс, частота модуляции 100 КГц, усиление  $1 \cdot 10^4 - 5.6 \cdot 10^5$ , постоянная времени 0.2 с, скорость развертки 10 мТ/200 с, микроволновая частота 9.6 ГГц. Ошибка измерения констант сверхтонкого расщепления не превышала 0.02 Гс. Калибровку спектрометра проводили с помощью стандартного раствора дифенилпикрилгидразида (DPPH, Aldrich). Контролем служили препараты БСА, не подвергавшиеся действию терагерцового излучения.

### Результаты и обсуждение

Было обнаружено, что в водном растворе БСА диамагнитное соединение ДПДО обра-

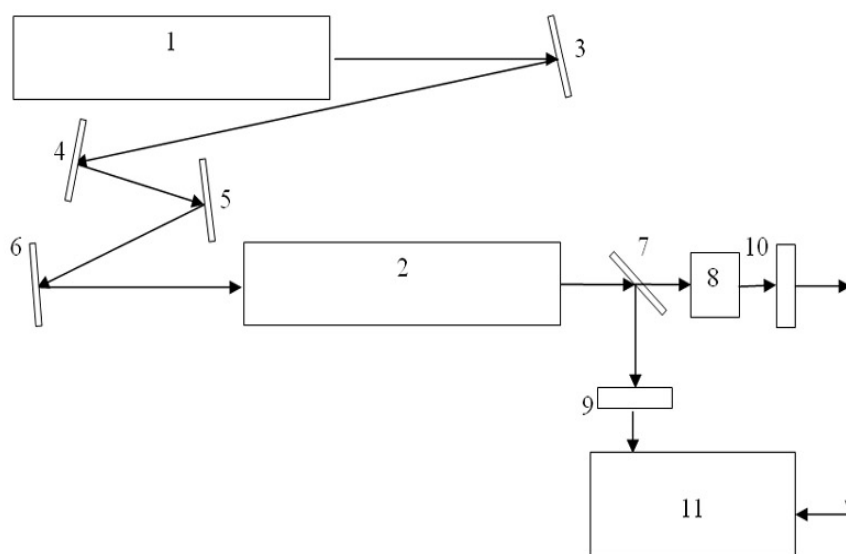


Рис. 1. Схема экспериментального стенда для облучения биообъектов: 1 – CO<sub>2</sub> лазер накачки, 2 – субмиллиметровый лазер, 3–6 – зеркала, 7 – пластинка из кристаллического кварца, 8 – подложка с исследуемым веществом, 9, 10 – пироэлектродетектор МГ-30, 11 – осциллограф С1-83

зует нитроксильный радикал, который наблюдается в спектрах ЭПР растворов. Сигнал представляет собой триплет с константой сверхтонкого взаимодействия  $a_N = 14.7$  Гс. На рис. 2 показаны спектры

ЭПР, наблюдаемые в растворах необлученного (а) и облученного (б) БСА в присутствии ДПДО.

Значение константы сверхтонкого взаимодействия для облученного и необлучен-

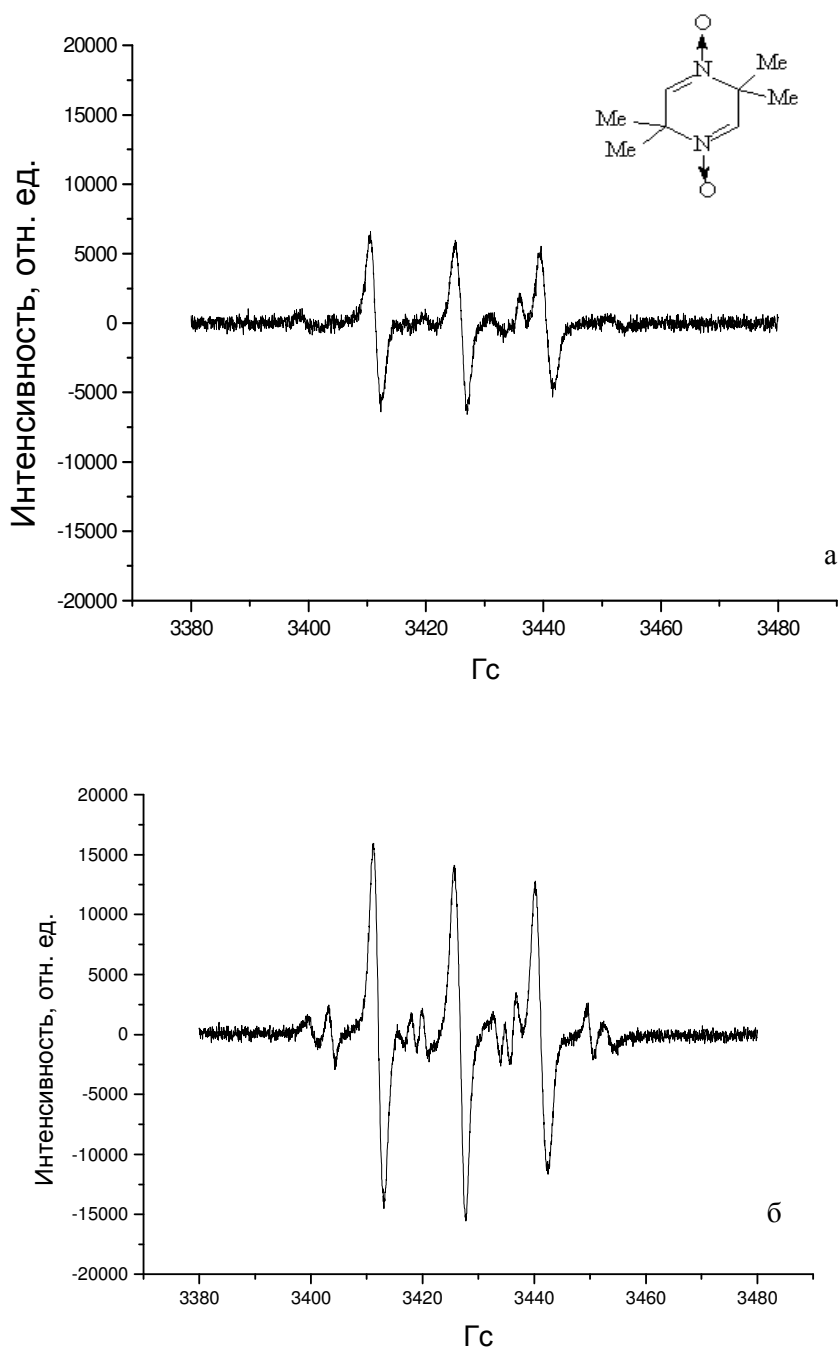


Рис. 2. Спектры ЭПР, наблюдаемые в водных растворах БСА в присутствии ДПДО (формула показана в верхней части): а – необлученный БСА, б – облученный БСА

ного препаратов БСА одинаково, тогда как амплитуда сигнала ЭПР в облученном образце выше приблизительно в 2 раза, чем в необлученном, что отражает увеличение количества парамагнитных центров, образующихся при взаимодействии с ДПДО. Ширина линии в спектре ЭПР необлученного образца равна 1.53 Гс, в спектре облученного – 1.95 Гс. Это свидетельствует о меньшей подвижности парамагнитного центра в облученном образце.

Полученные результаты подтверждают предположение об изменении конформации молекулы БСА, вызванном терагерцовым излучением.

Авторы выражают признательность Г. Г. Дульцевой и О. П. Черкасовой за обсуждение результатов работы.

#### Список литературы

1. Лаврик Н. Л., Немова Е. Ф. // Вестн. Новосиб. гос. ун-та. Серия: Физика. 2007. Т. 2, вып. 4. С. 96–101.

2. Черкасова О. П., Федоров В. И., Немова Е. Ф., Погодин А. С. // Оптика и спектроскопия. 2009. Т. 107, вып. 4. С. 565–568.

3. Govorun V. M., Tretiakov V. E., Tulyakov N. N., Fleurov V. B., Demin A. I., Volkov A. Yu., Batanov V. A., Kapitanov A. B. // Internat. J. Infrared and Millimeter Waves. 1991. V. 12. No. 12. P. 1469–1474.

4. Dultseva G. G., Skubnevskaya G. I., Tikhonov A. Ya et al. // J. Phys. Chem., 1996. Vol. 100. P. 17523–17527.

5. Грачев Г. Н., Захарьяш В. Ф., Клементьев В. М., Хамоян А. Г. // Квантовая электроника. 1999. Т. 28, № 2. С. 147–150.

22.09.2010