

СПОСОБ АНАЛИЗА ГЕЛЬ- ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ СО СПЕКТРАЛЬНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦИИ

Д.С. Тарасов^{1), 2)}, М.П. Самцов¹⁾, Е.В. Малюшкова¹⁾, И.И. Хлудеев²⁾, И.В. Семак²⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, Институт прикладных физических проблем
им. А.Н. Севченко, ул. Курчатова 7, 220045 Минск, Беларусь, dmitrij-tarasov@list.ru

²⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости 4, 220030 Минск, Беларусь,

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 Лэмбли 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 информацию для идентификации флуоресцентной метки и анализа ее состояния. На примере исследования гелевого электрофореза окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов бычьего сывороточного альбумина показана возможность обнаружения комплексов флуорофоров с белковыми молекулами.

Ключевые слова: трикарбоцианиновые красители; комплексобразование; белки плазмы крови; гелеэлектрофорез; лазерная флуоресцентная спектроскопия.

METHOD FOR ANALYSIS OF ELECTROPHOREGRAMS WITH SPECTRAL RESOLUTION OF FLUORESCENCE

Dmitri Tarasau^{1), 2)}, Michael Samtsov¹⁾, Elena Maliushkova²⁾, Ivan Khludeev²⁾, Igor Semak²⁾

¹⁾Sevchenko Institute of Applied Physics Problems, Belarusian State University,
7 Kurchatov Str., 220045 Minsk, Belarus

²⁾Belarusian State University,
4 Nezavisimosty Ave., 220030 Minsk, Belarus, dmitrij-tarasov@list.ru

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 счет разницы скоростей движения анализируемых

макромолекул с разным соотношением молекулярной массы к заряду в постоянном электрическом поле. Путем использования флуоресцентных меток становится возможным определение молекулярной массы белковых макромолекул и их фраг-

ментов. 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. Такое оборудование использовалось при исследовании взаимодействия индотрикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови [2]. Макет сканирующего устройства со спектральным разрешением конструктивно состоит из перемещаемой микрометрическими винтами платформы, на которой перпендикулярно исследуемой плоскости закреплен держатель световода лазерного флуоресцентного спектрометра. Путем перемещения светокolleктора вдоль белковых полос на электрофореграмме по флуоресценции определяли координаты молекул красителей. При этом информационным считался сигнал флуоресценции красите-

лей в случае его устойчивого превышения по сравнению с фоновым. 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.

Объекты и методы исследования

Основным объектом исследования выступал разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель ПК1, 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.

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 рН=7.4 (ФСБ). Концентрация белков в анализируемых на электрофореграмме 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 электрофореграмме проводились для двух серий образцов: при комнатной температуре (22 °С) и при инкубации в течение 120 минут при 37 °С.

Для флуоресцентных измерений использовался лазерный флуоресцентный спектрометр, 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 оптоволоконна.

Анализ связывания красителей с белками в растворах БСА выполнялся с помощью электрофореза белков по методу Лэмли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE). Электрофоретическое разделение белков проводили в 15 % полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях. 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. Полученные визуализированные электрофореграммы исследуемых образцов фиксировались с помощью фотоаппарата, и на снимки переносились координаты обнаружения красителей.

Обсуждение результатов

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. 1). Максимум полосы мономеров располагается вблизи 707 нм. Краситель ПК1 гид-

рофильный, 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).

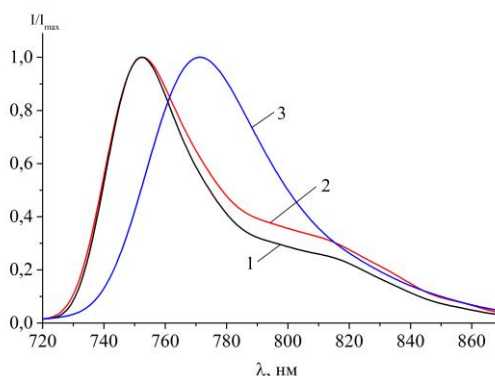


Рис. 1. Спектры флуоресценции трикарбоцианиновых красителей (10 мкМ) при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с рН=7,4: 1 – ПК1; 2 – ПК2; 3 – ПК3

Fig. 1. Fluorescence spectra of tricarbocyanine dyes (10 μM) in Dulbecco's sodium-potassium phosphate buffer (0.14 mol/L) with excitation by radiation with a wavelength of 684 nm of solutions with pH = 7.4: 1 – PD1; 2 – PD2; 3 – PD3

Спектральные параметры растворов ПК1 и ПК2 в растворах БСА (рис. 2) 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

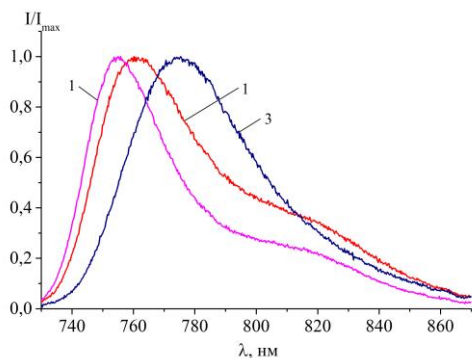


Рис. 2. Спектры флуоресценции при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм растворов трикарбацианиновых красителей (30 мкМ, 37 °С) в БСА для денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле: 1 – ПК1; 2 – ПК2; 3 – ПК3
Fig. 2. Fluorescence spectra with excitation by radiation with a wavelength of 684 nm of solutions of tricarbocyanine dyes (30 μM, 37 °C) in BSA for denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel: 1 – PD1; 2 – PD2; 3 – PD3

флуоресцентным спектрометром гель-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.

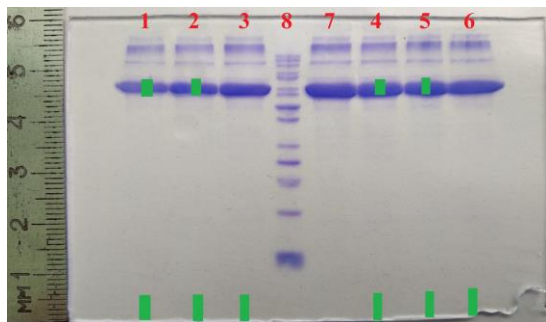


Рис. 3. Электрофореграммы окрашенных трикарбацианиновыми красителями растворов БСА: 1 – ПК1, 22 °С; 2 – ПК2, 22 °С; 3 – ПК3, 22 °С; 4 – ПК1, 37 °С; 5 – ПК2, 37 °С; 6 – ПК3, 37 °С; 7 – раствор без красителей; 8 – набор белков стандартов с известными молекулярными массами
Fig. 3. Electropherograms of BSA solutions stained with tricarbocyanine dyes: 1 – PD1, 22 °C; 2 – PD2, 22 °C; 3 – PD3, 22 °C; 4 – PD1, 37 °C; 5 – PD2, 37 °C; 6 – PD3, 37 °C; 7 – solution without dyes; 8 – set of protein standards with known molecular weights

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. 4), 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.

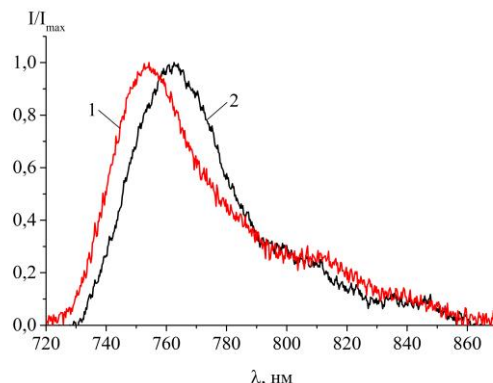


Рис. 4. Спектры флуоресценции комплексов трикарбацианиновых красителей с альбумином на электрофореграмме при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм: 1 – ПК1; 2 – ПК2
Fig. 4. Fluorescence spectra with excitation by radiation with a wavelength of 684 nm of complexes of tricarbocyanine dyes with albumin on electropherogram

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 визуальное присутствие каких-либо белков. Молекулярная масса исследованных красителей: ПК1 – 1270 Да, ПК2 – 740 Да,

ПКЗ –1117 Да. Учитывая точность определения координаты, справедливо утверждать, что в данной области обнаруживаются несвязанные с белками красители. Происходит батохромное смещение максимумов спектров флуоресценции на ~8 нм по сравнению со спектрами красителей в ФСБ (рис. 5). 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.

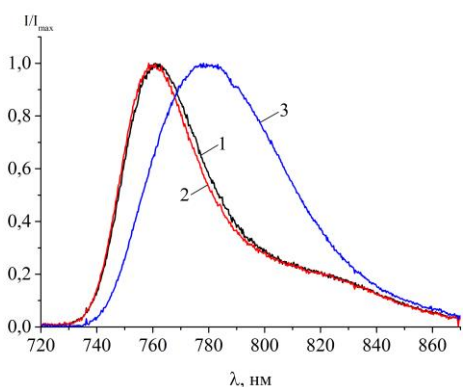


Рис. 5. Спектры флуоресценции при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм несвязанных с белками трикарбоцианиновых красителей на электрофореграмме: 1 – ПК1; 2 – ПК2

Fig. 5. Fluorescence spectra with excitation by radiation with a wavelength of 684 nm of unbound to proteins tricarbo-cyanine dyes on electrophoregram

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.

Библиографические ссылки

1. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 2004; 22(12): 1567-1572.
2. Самцов М.П., Тарасов Д.С., Малюшкова Е.В., Хлудеев И.И., Луговский А.А., Семак И.В. Гель-электрофорез комплексов трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы. В кн.: Медэлектроника–2020. Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии: сб. науч. ст. XII Междунар. науч.-техн. конф. (10 декабря 2020 года), г. Минск, Республика Беларусь. Минск: БГУИР; 2020. С. 125-132.
3. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevsky K.N., Petrov P.T., Voropay E.S., Tarasau D.S., Istomin Y.P. Novel indotricarbo-cyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 2016; 316: 31-36.

References

1. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 2004; 22(12): 1567-1572.
2. Samtsov M. P., Tarasov D. S., Maliushkova E. V., Khludayev I. I., Lugovski A. A., Semak I. V. Gel-electrophoresis of complexes of tricarbo-cyanine dyes with blood plasma proteins. V kn.: Medelektronika–2020. Sredstva medi-tsinskoy elektroniki i novye meditsinskie tekhnologii: sb. nauch. st. XII Mezhdunar. nauch.-tekhn. konf. (10 dekabrya 2020 goda), g. Minsk, Respublika Belarus'. Minsk: BGUIR; 2020. S. 125-132 (In Russian).
3. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevsky K.N., Petrov P.T., Voropay E.S., Tarasau D.S., Istomin Y.P. Novel indotricarbo-cyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 2016; 316: 31-36.