

03;09;14

Сенсорная система для регистрации малых концентраций сероводорода в водных растворах на основе люминесцентного белкового комплекса в биополимерной матрице

© А.А. Сергеев^{1,2}, А.А. Леонов^{1,2}, Д.Г. Каменев³,
С.С. Вознесенский^{1,2} Ю.Н. Кульчин^{1,2}

¹ Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН, Владивосток

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

³ Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток

E-mail: Sergeev@iacp.dvo.ru

Поступило в Редакцию 15 марта 2017 г.

Представлены результаты исследований люминесцентных белковых комплексов на основе белка миоглобина с ковалентно связанным люминофором СУЗ, сформированных в пленке полисахарида агарозы, как элементов, чувствительных к растворенному в воде сероводороду. В присутствии аналита происходит изменение спектра поглощения миоглобина, которое оказывает влияние на эффективность возбуждения люминофора и практически не влияет на его спектр эмиссии. Данный эффект демонстрирует возможность создания люминесцентной сенсорной системы, оптический отклик которой формируется за счет изменения эффективности возбуждения люминесценции чувствительного элемента, вызванного присутствием аналита. Предел обнаружения растворенного в воде сероводорода составил 100 рМ.

DOI: 10.21883/PJTF.2017.18.45031.16772

Спектральные методы определения химического состава жидких и газовых сред являются мощным инструментом аналитической химии. Базируясь на двух основных принципах формирования оптического сенсорного отклика — изменении оптического поглощения и/или параметров люминесценции сенсорной системы в присутствии определяемого вещества (аналита), данные методы обеспечивают селективность и высокую чувствительность [1–5]. Одним из способов построения хемосен-

сорных систем такого вида является внедрение в оптически инертную матрицу оптически активного элемента, формирующего хемосенсорный отклик в присутствии аналита [6–8]. При этом свойства матриц, такие как оптическая прозрачность, биосовместимость, гидрофобность или гидрофильность, определяют области использования сенсоров на их основе. Среди материалов для формирования матрицы отдельное место занимают биополимеры, предоставляющие уникальную возможность получения функциональных структур методами самоорганизации и самосборки, обладающие легкостью модификации оптически активными веществами и хорошей проницаемостью для молекул различных аналитов [9,10].

Задача определения присутствия малых концентраций сероводорода в водных средах имеет важное практическое значение, поскольку этот газ является продуктом метаболизма живых систем и разложения органики. Например, при проведении биомедицинских исследований сенсорные системы должны обеспечивать регистрацию сероводорода в растворе на уровне не хуже $10\ \mu\text{M}$ [11].

В настоящей работе показана возможность создания сенсорной системы на основе люминесцирующего белкового комплекса, образованного белком миоглобином, ковалентно связанным с люминофором CY3, и внедренного в биополимерную матрицу из агарозы. При реакции с сероводородом у миоглобина возникает пик поглощения в области люминесценции CY3, что оказывает влияние на эффективность возбуждения люминофора, формируя сенсорный отклик. Агароза обеспечивает надежную фиксацию в объеме матрицы и проницаемость для молекул сероводорода. Для приближения к реальным условиям биомедицинских измерений исследования сенсорного отклика проводились в фосфатно-солевом буфере (PBS), имеющем $\text{pH} = 8$ [12].

Миоглобин (Sigma Aldrich) растворялся в $100\ \text{mM}$ PBS. К полученному раствору белка добавлялась сульфатированная форма красителя CY3 (Sylfo-CY3 NHS Ester, Lumiprobe) в соотношении белок/краситель 1/2 [13]. Реакционная смесь объемом $500\ \mu\text{l}$ инкубировалась в течение $60\ \text{min}$ при комнатной температуре. После инкубации смесь очищалась методом гель-фильтрации на хроматографической системе BioLogic LP (Bio-Rad). В качестве источника сероводорода использовался $100\ \text{mM}$ раствор гидросульфида натрия NaSH (Sigma-Aldrich) в PBS.

Сенсорные системы получались путем смешивания конъюгата белкового комплекса с 1% водным раствором высокочистой агарозы

(Sigma-Aldrich) и для достижения требуемой толщины наносились методом полива между двумя стеклянными подложками площадью 100×100 mm, разделенными прокладкой толщиной 500 μ m.

Для проведения исследований на сенсорный образец размером 3×3 mm наносилось 100 μ l раствора H_2S требуемой концентрации. Хорошие гидрофильные свойства агарозы обеспечивали быструю диффузию аналита в объем образца. Сразу после нанесения аналита измерялись его люминесцентные характеристики.

Исследования люминесцентных характеристик образцов выполнялись на спектрофлуориметре Horiba Fluorolog-3 (Jobin Yvon, Japan). Спектры люминесценции регистрировались в диапазоне длин волн 555–700 nm с шагом 1 nm и временем усреднения 0.1 s. Возбуждение люминесценции производилось в максимуме поглощения люминофора 545 nm. Для проведения исследований кинетики спектры люминесценции регистрировались с шагом 3 min до прекращения изменения интенсивности люминесценции. Время срабатывания сенсорной системы определялось максимумом второй производной интенсивности люминесценции по времени. Экспериментальные данные получались по усредненным значениям для трех измерений каждой концентрации аналита при температуре 21°C.

На рис. 1 приведены спектры поглощения образцов в исходном состоянии и в присутствии молекул сероводорода, а также интенсивность люминесценции чистого люминофора $CY3$. Известно, что при реакции с сероводородом происходит сульфатация миоглобина [14] и возникают пики поглощения с максимумами вблизи $\lambda_1 \approx 550$ nm и $\lambda_2 \approx 580$ nm.

Наибольший интерес представляет собой пик поглощения с максимумом вблизи $\lambda \approx 550$ nm, поскольку он почти полностью соответствует длине волны максимума возбуждения чистого люминофора $CY3$.

На рис. 2 представлены спектры поглощения и люминесценции исследуемых образцов сенсорной системы, а также их изменение в присутствии сероводорода. Нетрудно заметить, что присутствие сероводорода оказывает влияние только на интенсивность люминесценции и не влияет на характер спектральной картины.

Отсутствие полос поглощения сульфатированной формы миоглобина в спектре люминесценции $CY3$ связано с низкой степенью поглощения миоглобина по сравнению с высокой интенсивностью люминесценции $CY3$. В то же время существующего поглощения миоглобина на длине волны $\lambda_1 \approx 550$ nm (рис. 1) оказывается достаточно для

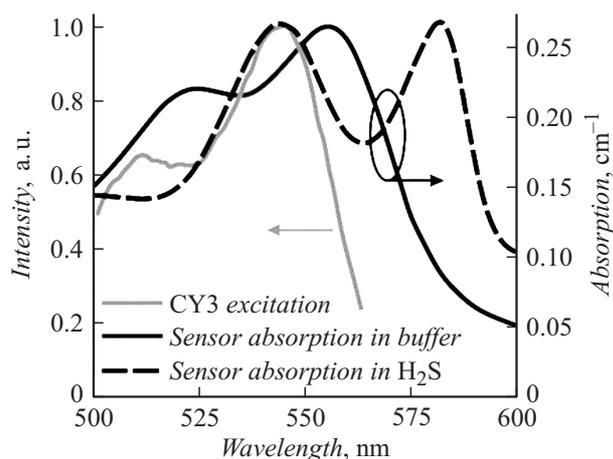


Рис. 1. Спектры поглощения образцов сенсорной системы в исходном состоянии и в присутствии молекул сероводорода (левая ось ординат соответствует интенсивности люминесценции чистого люминофора CY3).

того, чтобы снизить эффективность возбуждения CY3. В результате в присутствии сероводорода происходит уменьшение эффективности возбуждения CY3 и, как следствие, уменьшение интенсивности его люминесценции. При этом существенных различий в величине времени жизни люминесценции исходных и сульфатированных образцов обнаружено не было.

Полученные результаты свидетельствуют об образовании специфической химической связи в комплексе миоглобин–CY3, накладывающей ограничения на формирование процессов фотоиндуцированного переноса электрона [15] или флуоресцентного резонансного переноса энергии [16]. Известно [14], что полоса поглощения сульфатированного миоглобина с максимумом вблизи 550 nm формируется вследствие нестехиометрического окисления железа сероводородом с образованием оксидных форм железа, обладающих высоким коэффициентом экстинкции. В связи с этим сенсорный отклик возникает за счет первичного поглощения возбуждающего излучения на нестехиометрически окисленном железе миоглобина, а затем на центрах фоточувствительности люминофора.

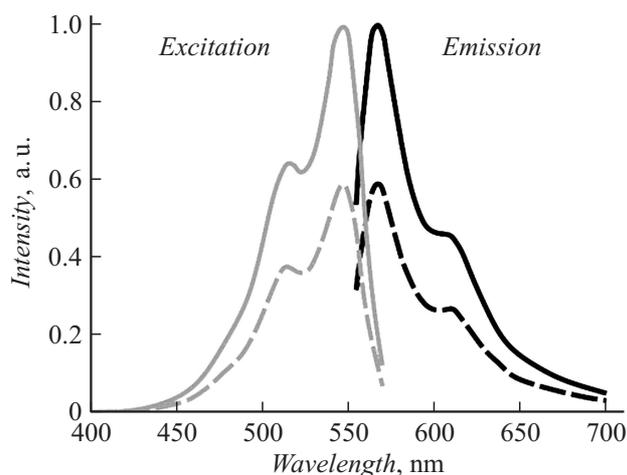


Рис. 2. Спектры возбуждения и люминесценции исследуемых образцов сенсорной системы (сплошные линии) и их изменение в присутствии сероводорода (штриховые линии).

На рис. 3, *a* представлены результаты исследования кинетики формирования отклика сенсорных образцов при воздействии различных концентраций сероводорода. Для образцов с чистым PBS характерно небольшое уменьшение интенсивности люминесценции (рис. 3, *a*), связанное с влиянием изменения уровня pH на интенсивность люминесценции СУЗ. В присутствии сероводорода характер тушения люминесценции изменяется, а уменьшение интенсивности люминесценции имеет большую амплитуду.

Таким образом, на характер люминесценции исследуемых образцов в присутствии сероводорода оказывают влияние два процесса: уменьшение ее интенсивности вследствие изменения уровня pH и уменьшение эффективности возбуждения СУЗ при сульфатации миоглобина. В наших экспериментах нижний предел обнаружения сероводорода составил 100 pM. Скорость изменения интенсивности люминесценции зависит от концентрации сероводорода и достигает насыщения при ее значении порядка 1 μ M. Время срабатывания сенсора (t_r) составило порядка 8 min после контакта с аналитом.

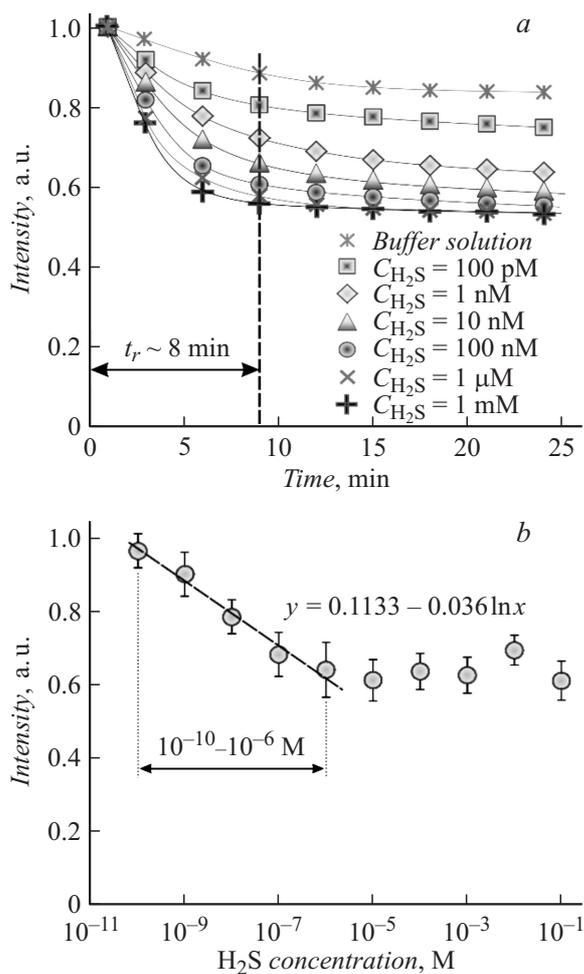


Рис. 3. Сенсорный отклик исследованных образцов на присутствие сероводорода: *a* — кинетика формирования отклика при различных концентрациях сероводорода, *b* — зависимость интенсивности люминесценции образцов от концентрации сероводорода.

На рис. 3, *b* приведена зависимость интенсивности люминесценции сенсорных образцов от концентрации сероводорода для времени t_r . Это позволяет определить диапазон концентраций сероводорода, в котором использование разработанной сенсорной системы целесообразно. Можно видеть, что разработанная сенсорная система имеет линейный диапазон изменения интенсивности люминесценции при концентрациях сероводорода 10^{-10} – 10^{-6} М, ошибка измерений не превышает 10%.

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность создания люминесцентной сенсорной системы на основе белковых комплексов, сформированных путем ковалентной связи люминофора СУЗ с миоглобином в биополимерной матрице. Показано, что оптический отклик такой системы формируется за счет изменения эффективности возбуждения люминесценции, вызванного присутствием аналита, с сохранением спектрального положения эмиссии. Достигнутый предел обнаружения растворенного в воде сероводорода (100 рМ) отвечает требованиям, предъявляемым к сенсорным системам сероводорода для проведения биомедицинских исследований.

Синтез белковых комплексов выполнен в рамках проекта ИСГЗ 0262-2015-001-112, исследование люминесцентных характеристик белковых комплексов проведено в рамках гранта Президента № МК-8089.2016.2, исследования динамики формирования сенсорного отклика и его зависимости от концентрации сероводорода осуществлены при поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение № 14-50-00034).

Список литературы

- [1] Prodi L., Bolletta F., Montalti M., Zaccheroni N. // *Coord. Chem. Rev.* 2000. V. 205. Iss. 1. P. 59–83.
- [2] Kameneva P.A., Imbs A.B., Orlova T.Yu. // *Toxicon.* 2015. V. 98. P. 1–3.
- [3] Golik S.S., Ilyin A.A., Babiy M.Yu., Biryukova Yu.S., Lisitsa V.V., Bukin O.A. // *Plasma Sci. Technol.* 2015. V. 17. N 11. P. 975–978.
- [4] Ilyin A.A., Golik S.S., Shmirko K.A. // *Spectrochim. Acta B.* 2015. V. 112. P. 16–22.
- [5] Keefe M.H., Benkstein K.D., Hupp J.T. // *Coord. Chem. Rev.* 2000. V. 205. Iss. 1. P. 201–228.
- [6] Lee S.H., Kumar J., Tripathy S.K. // *Langmuir.* 2000. V. 16. Iss. 26. P. 10482–10489.

- [7] *Mironenko A.Y., Sergeev A.A., Nazirov A.E., Modin E.B., Voznesenskiy S.S., Bratskaya S.Y.* // *Sensors Actuators B*. 2016. V. 225. P. 348–353.
- [8] *Wolfbeis O.S.* // *J. Mater. Chem.* 2005. V. 15. Iss. 27-28. P. 2657–2669.
- [9] *Anastas P., Eghbali N.* // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. N 1. P. 301–312.
- [10] *Adhikari B., Majumdar S.* // *Prog. Polym. Sci.* 2004. V. 29. Iss. 7. P. 699–766.
- [11] *Jha S., Calvert J.W., Duranski M.R., Ramachandran A., Lefer D.J.* // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008. V. 295. Iss. 2. P. H801–H806.
- [12] *Strianese M., De Martino F., Pellicchia C., Ruggiero G., D'Auria S.* // *Protein Pept. Lett.* 2011. V. 18. N 3. P. 282–286.
- [13] *Aslam M.W., Tabares L.C., Andreoni A., Canters G.W., Rutjes F.P.J.T., van Delft F.L.* // *Pharmaceuticals*. 2010. V. 3. Iss. 3. P. 679–701.
- [14] *Nicholls P.* // *Biochem. J.* 1961. V. 81. Iss. 2. P. 374–383.
- [15] *Ceroni P., Balzani V.* *The exploration of supramolecular systems and nanostructures by photochemical techniques.* Springer Netherlands, 2012. P. 21–38.
- [16] *Liu J., Sun Y.Q., Zhang J., Yang T., Cao J., Zhang L., Guo W.A.* // *Chem. Eur. J.* 2013. V. 19. Iss. 15. P. 4717–4722.