

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии

**Влияние температуры на импринтинг бычьего сывороточного  
альбумина**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 413 группы  
направления 04.03.01 «Химия»  
Института химии  
Ленивой Анны Алексеевны

Научный руководитель  
проф., д.х.н., доцент

\_\_\_\_\_

Н.А. Бурмистрова

Заведующий кафедрой  
д.х.н., проф.

\_\_\_\_\_

И.Ю. Горячева

Саратов 2025

## ВВЕДЕНИЕ

Импринтированные белки являются одним из путей к получению биосинтетических рецепторных элементов. Поиск путей сокращения времени, количества операций и используемых реагентов, необходимых для получения ИБ является актуальным в плане снижения стоимости, упрощения и масштабирования методов их получения. Белковые молекулы являются подвижными биополимерными материалами, их конформация подвержена влиянию как параметров растворителя, так и температурной обработки. Нагревание и последующее охлаждение раствора белковых молекул приводит к изменению их размера за счёт частичной или полной денатурации, позволяя временно увеличивать площадь для взаимодействия с молекулами шаблона. Этот факт позволяет предположить возможность отказа от этапа протонирования или депротонирования. Однако к настоящему времени использование термической денатурации для получения ИБ не изучалось.

Целью работы являлось исследование влияния температуры и кислотности среды на процесс импринтинга бычьего сывороточного альбумина (БСА) специфичного к имазамоксу. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучение влияния температуры и кислотности среды на спектроскопические свойства БСА и смеси БСА и 4-гидроксикумарина (4-ГК).
2. Изучение стабильности молекулы БСА после температурного воздействия на образец во времени.
3. Выбор оптимальных условий импринтинга БСА в присутствии имазамокса.
4. Оценка возможности применения импринтированного БСА для определения имазамокса.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## 1 Литературный обзор

### 1.1 Выбор целевой молекулы

Гербициды и пестициды широко используются в сельском хозяйстве для борьбы с сорняками и плесневыми грибами. Внесение избыточных количеств гербицидов, обладающих токсичностью, наносит серьезный урон окружающей среде: животным и человеку, вызывая нарушения работы эндокринной системы, а также оказывая канцерогенное и мутагенное действие [1]. Одними из представителей гербицидов, используемых в том числе в Саратовской области, являются соединения имидазолинонового ряда — имазамокс, имазапик и др. Некоторые имидазолиноны действуют избирательно, в то время как другие действуют на широкий спектр злаковых и бобовых растений и сохраняются в почве на длительное время, что ограничивает выбор посевных культур после использования таких гербицидов [2].

### 1.2 Синтетические рецепторы

Синтетические МИП являются эффективной заменой природных рецепторных элементов, обладающих следующими недостатками: высокая стоимость и низкая стабильность [3]. По сравнению с ними, МИП обладают такими преимуществами, как высокая селективность из-за специфического связывания с молекулой-шаблоном, сравнительно низкая стоимость, а также простота проведения эксперимента. К достоинствам также относят стабильность в широком диапазоне pH, растворителей и температур [4].

#### 1.2.1 Молекулярно-импринтированные полимеры

Основными областями применения МИП являются анализ экологических, пищевых и биологических образцов, предварительное концентрирование. Получение МИП обычно происходит по одному из трёх распространённых методов: синтез, инверсия с осаждением или поверхностное штампование. К

наиболее часто используемым методом относится синтез МИП из мономеров в присутствии молекулы-шаблона.

Одним из перспективных подклассов МИП являются импринтированные белки (ИБ). Рецепторы, получаемые на основе ИБ, занимают промежуточное положение между синтетическими и природными рецепторами.

### **1.2.2 Импринтированные белки**

Другим направлением являются МИП, основанные не на синтетических, а на биологических материалах, таких, как белки. Белки имеют подвижную структуру, которая меняется, если менять окружающие молекулу условия, такие как температура, кислотность, добавки солей, растворитель, лиганд-белковые взаимодействия.

Получение ИБ включает несколько стадий, практически не изменяющихся в работах Лю [5], Матиассона [6] и Белоглазовой [7]: протонирование белковой молекулы для измерения её конформации, добавление молекулы-шаблона и депротонирование с последующей фиксацией конформации и вымывание шаблона.

### **1.2.3 Выбор молекулы-шаблона**

В качестве молекулы шаблона может выступать как аналит, так и «фиктивные» шаблоны — структурные аналоги, имеющие те же функциональные группы. Выбор молекулы-шаблона включает в себя: учёт доступности, стабильности молекулы, её способности образовывать связи с матричной молекулой, а также её сходство с определяемым веществом, если оно обладает сильно выраженным токсическим действием и высокой стоимостью.

В работе в качестве молекулы-шаблона выбран имазамокс, популярный из-за эффективности среди гербицидов.

#### **1.2.4 Выбор матричной молекулы**

Выбор матричной молекулы является важным этапом получения ИБ. На выбор матричного белка влияют: структура лиганда, лёгкость образования комплекса белок–лиганд, количество сайтов связывания в белке, размер белковой молекулы и коммерческая доступность. Нами выбран бычий сывороточный альбумин.

#### **1.3 Термический импринтинг**

В качестве альтернативного метода импринтинга белков используется термический импринтинг. Изменение температуры приводит к таким изменениям в белковых молекулах, как агрегация, изменение конформации, а также обратимая или необратимая денатурация.

Термический импринтинг теоретически позволит уменьшить время получения ИБ, уменьшив количество этапов и уменьшить количество органических растворителей при получении катализаторов.

#### **1.4 Получение конъюгатов**

В качестве красителя выбран 6-аминофлуоресцеин (6-АмФ), или 5-амино-3',6'-дигидроксипиро[2-бензофуран-3',9'-ксантен]-1-он, обладающий выраженной флуоресцентной способностью, что позволяет использовать его как метку в исследованиях с предварительным конъюгированием с целевой молекулой.

### **2 Экспериментальная часть**

#### **2.1 Реактивы и материалы**

В работе использовали бычий сывороточный альбумин, имазамокс 98% технический. В качестве растворителя использовали бидистиллированную воду. Растворы хлороводородной кислоты (0,1М) и гидроксида натрия (0,1М,

5M) применяли для создания необходимой кислотности растворителя. Для приготовления конъюгатов использовали 6-аминофлуоресцеин.

Влияние температуры на конформацию индивидуального БСА и уже импринтированного белка изучали при помощи спектральных методов. Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV-1800», спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре «Cary Eclipse». Измерение размеров БСА осуществляли методом динамического рассеивания света с использованием комплекса оборудования для исследования характеристик дисперсных систем Zetasizer Advance Ultra. Кислотность растворов устанавливали с использованием рН-метра АВ33РН и электрода ST310. Для очистки ИБ использовали центрифугу Eppendorf 5430 R без ротора с плёночной клавиатурой, а также фильтры для центрифугирования JetSpin Centrifugal Filter. Для промывания конъюгатов использовали колонки PD-10 Columns заполненные смолой Sephadex G-25M.

## **2.2 Изучение влияния условий**

Для изучения влияния температуры и кислотности среды на конформацию БСА исходный раствор белка (1 мг/мл) готовили растворением навески в соответствующем растворителе в течение 30 минут непосредственно перед работой. Затем растворы белка и смеси БСА - 4-ГК нагревали на водяной бане до 20, 40, 50, 60, 80°C в течение 30 минут при постоянном перемешивании, после чего образцы охлаждали до комнатной температуры. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне 200–600 нм, трёхмерные спектры флуоресценции регистрировали при ширине щелей возбуждения: 5 нм, щелей испускания — 10 нм. Размерные характеристики БСА оценивали при 20°C после проведения нескольких измерений (n=3). Стабильность белка изучена при комнатной температуре и при 4°C. Образцы выдерживали при комнатной температуре или при 4°C в течение 24 и 168 часов, после чего проводили спектральные измерения индивидуального БСА и смеси БСА + 4-ГК.

### **2.3 Импринтинг белков**

Получение импринтированных белков в заранее выбранных условиях проводили по следующей методике. Исходный раствор БСА (1 мг/мл) доводили до нужного значения рН (в двух образцах рН = 2, а в одном рН = 5). Затем два образца нагревали на водяной бане до 65°C в течение 20 минут. После охлаждения во все смеси добавляли имазамокс (0,1 мг/мл) и доводили до рН 8 титрованием для последующей перекрёстной сшивки глутаровым альдегидом.

Очистку от шаблона на центрифуге вели на центрифужном фильтре с ограничением по молекулярной массе 5000 Да при температуре 4°C, выдерживая 10 минут при числе оборотов 4000.

### **2.4 Приготовление конъюгатов**

Для приготовления конъюгатов использовалась последовательность, описанная в сборнике Германсона [8] глава 4, пункт 1.2.

Для оценки возможного применения полученные ИБ иммобилизовали в лунках микропланшета на ночь (фосфатно-солевой буфер (ФСБ), 100 мкл/лунка, 4°C, 18 ч), а затем заполняли блокирующим буфером (ФСБ, содержащий 0,2% по массе БСА, 200 мкл/лунка) в течение 30 минут при 37 °C. Стандартные растворы анализируемого вещества (имазамокс, ФСБ, 70 мкл) и конъюгата Имаз–6-АмФ (ФСБ, 70 мкл) смешивали на микропланшете без связывающих свойств, переносили 100 мкл раствора с модифицированными ИБ и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C.

После каждого этапа лунки трижды промывали ФСБ. После трёхкратного промывания, в каждую лунку добавляли 100 мкл ФСБ и проводили регистрацию трёхмерных спектров флуоресценции при следующих параметрах:  $\lambda_{\text{возб.}}$  = 485 нм,  $\lambda_{\text{исп.}}$  = 528 нм, высота измерения = 6,5 мм. Для проверки селективности проводили ИБ-КТФА с повышенной

концентрацией имазамокса (до 1 мкг/мл) и Имаз-6-АмФ, разбавленные в 20 раз.

### **3 Результаты и обсуждение**

#### **3.1 Изучение влияния условий проведения эксперимента на конформацию БСА**

##### **3.1.1 Влияние температуры на спектральные характеристики**

БСА характеризуется максимумом поглощения при  $\sim 278$  нм. При переходе от рН 2 к рН 5 наблюдаются сдвиг максимума поглощения в батохромную область с 278 до 283 нм, а при переходе от рН 5 к рН 8 до 285 нм, что может быть связано с изменением конформации белковой молекулы.

Спектральный метод, позволяющий увидеть изменение конформации белковой молекулы — флуоресценция. Флуоресценция БСА характеризуется появлением длины волны испускания при 338 нм, длиной волны возбуждения является  $\approx 350$  нм.

На тепловых картах растворов БСА после воздействия температуры наблюдаются незначительное изменение интенсивности флуоресценции, что может свидетельствовать об отсутствии изменений в конформации белка. Окружение вокруг остатков триптофана не меняется или меняется незначительно, при повышении температуры — термическая денатурация при рН 2 обратима. При рН 5 наблюдается усиление интенсивности флуоресценции БСА при всех температурах по сравнению с интенсивностями при рН 2. При рН 8 интенсивность флуоресценции уменьшается по сравнению с рН 5 с 285 до 265. При  $80^{\circ}\text{C}$  белок денатурировал необратимо, что следует из уменьшения интенсивности флуоресценции.

##### **3.1.2 Влияние температуры на спектральные характеристики БСА в присутствии 4-ГК**

На рисунке 1 представлена трансформация спектров поглощения смеси БСА - 4-ГК. Представленные данные показали появление дополнительных максимумов, что совпадает со спектральной картиной растворов 4-ГК в соответствующих рН. Кроме того, наблюдается перекрывание максимума поглощения БСА и 4-ГК.

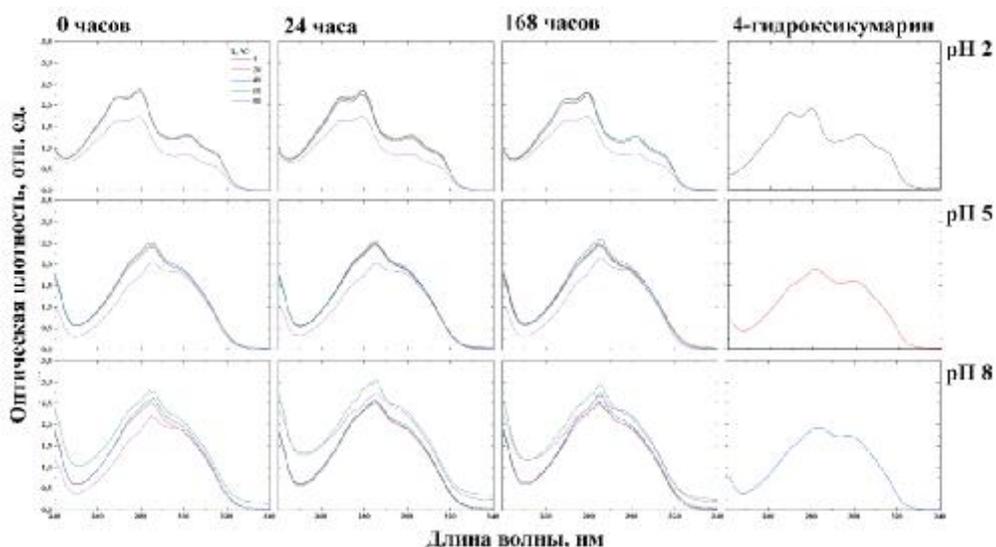


Рисунок 1 — Влияние температуры, рН и времени на спектры поглощения смеси БСА + 4-ГК

Для спектров флуоресценции также возможно изменение положения характеристических максимумов, обусловленное совпадением спектров флуоресценции БСА и 4-ГК. При рН 2 происходит тушение интенсивности флуоресценции как для БСА, так и для 4-ГК. При 80°C наблюдается усиление с 600 до 800 интенсивности флуоресценции для области, отвечающей флуоресценции белка, что свидетельствует о связывании между 4-ГК и БСА. При рН 5 наибольший вклад в интенсивность флуоресценции оказывают молекулы 4-ГК. О связывании БСА и 4-ГК свидетельствует тушение флуоресценции. В слабощелочной среде при рН 8 наблюдается та же картина, что и для рН 5 — за область наибольшей интенсивности флуоресценции отвечает белковая часть молекулы и наилучшее связывание происходит при температуре 50.

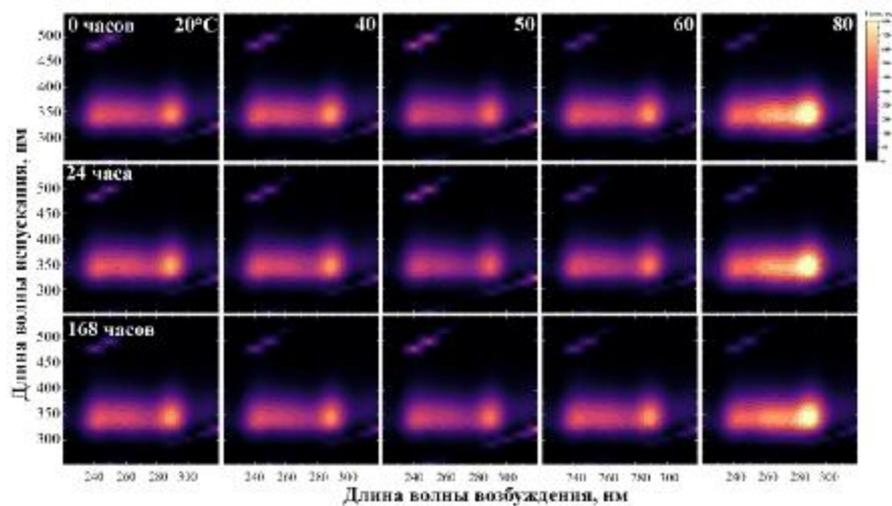


Рисунок 2 — Тепловые карты для смеси БСА и 4-ГК при pH 2

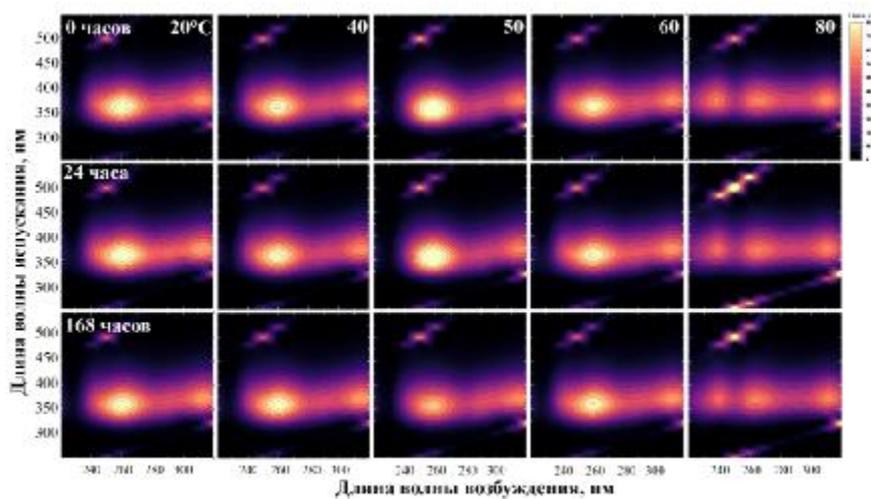


Рисунок 3 — Тепловые карты для смеси БСА и 4-ГК при pH 5

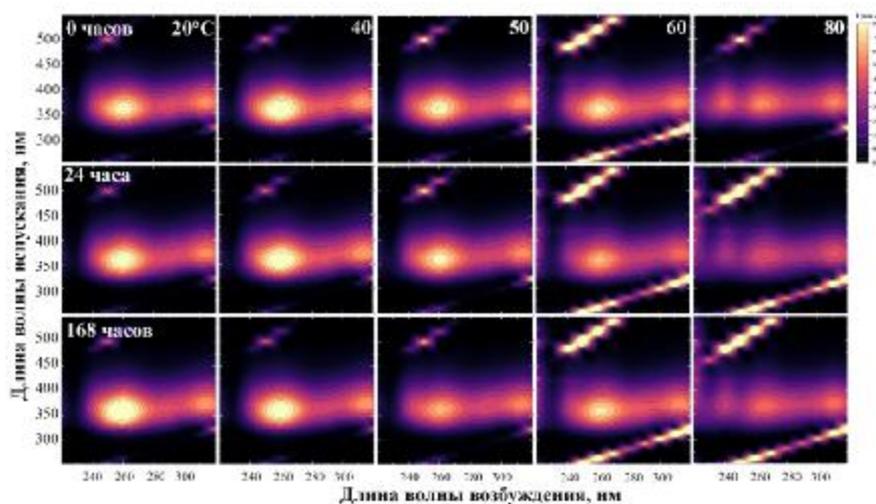


Рисунок 4 — Тепловые карты для смеси БСА и 4-ГК при pH 8

## 3.2 Температурное воздействие на импринтинг БСА

### 3.2.1 Получение импринтированного белка

Как было уже указано раньше, максимум поглощения БСА находится около 278 нм. При импринтинге наблюдается сдвиг в батохромную область во всех образцах. В условиях рН 2 и нагревании сдвиг наблюдается с 278 до 276 нм, а при переходе к рН 5 сдвиг увеличивается вплоть до 273 нм. Для образца, приготовленного без нагревания при рН 2 сдвиг наблюдается до 275 нм. Полученные данные свидетельствуют о том, что наилучшее взаимодействие с образованием ассоциатов между БСА и имазамоксом произошло в условиях рН 2 при нагревании до 65°C.

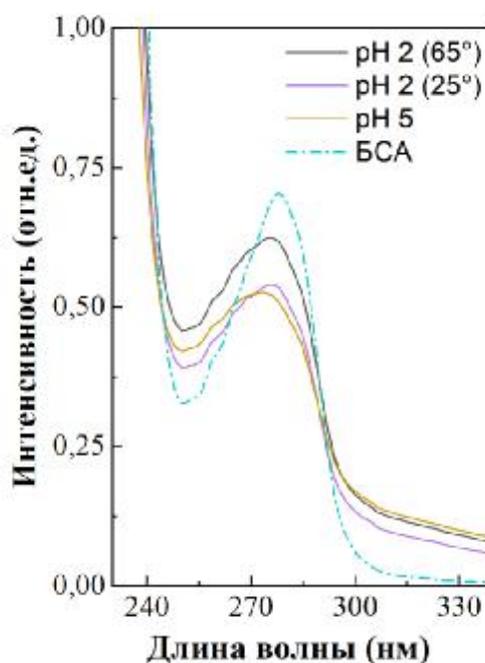


Рисунок 5 — Нормированные спектры поглощения импринтированных белков при различных условиях кислотности и температуры

### 3.2.2 Приготовление конъюгата

Вымывание конъюгата имазамокса и 6-аминофлуоресцеина происходит с 4 по 9 фракции включительно. 9 и последующие фракции отображают

спектр 6-АмФ с максимумом при 495 нм и остаточные количества имазамокса.

### 3.3 Оценка применения полученного ИБ

Для оценки применения ИБ, приготовленных при воздействии на их конформацию температуры, использовали формат конкурентного иммуноанализа с использованием в качестве рецепторов импринтированный БСА иммобилизованный на поверхности микропланшета. Меченный 6-АмФ имазамокс конкурировал с имазамоksom в растворе за центры связывания в импринтированном БСА.

По полученным данным можно сделать вывод о том, что термическое воздействие на образец положительно сказывается на его аналитических свойствах и позволяет более чувствительно определить наличие имазамокса в растворе.

Таблица 1 — Аналитические характеристики ТФА на основе БСА импринтированного при различных условиях

Характеристики образца	pH 2, 25°C	pH 2, 65°C	pH 5, 65°C
<b>Свободный член</b>	0,032 ± 0,015	0,007±0,006	0,182±0,064
<b>Угловой коэффициент</b>	-0,143±0,021	-0,191±0,017	-0,325±0,035
<b>R<sup>2</sup></b>	0,957	0,985	0,978
<b>Предел обнаружения (пг/мл)</b>	12	2	2
<b>Предел определения (пг/мл)</b>	36	7	6
<b>Диапазон определения (пг/мл)</b>	5-905	5-960	5-950

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено влияние температуры и кислотности среды на процесс импринтинга бычьего сывороточного альбумина специфичного к имазамоксу, показано увеличение эффективности аналитических характеристики ИБ при использовании температурного воздействия в процессе импринтинга.

2. Показано, что температура в диапазоне 20-80°C не влияет на спектроскопические свойства БСА, для раствора БСА – 4-ГК наблюдается сдвиг полосы поглощения при 80°C.

3. Изучено влияние температуры и pH среды на спектроскопические свойства импринтированного БСА, полученного в присутствии имазамокса, выбраны оптимальные условия импринтинга.

4. Оценено влияние условий получения импринтированного БСА на аналитические характеристики определения имазамокса в формате твердофазного конкурентного анализа.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Li X. et al. Study on the toxicity prediction model of acetolactate synthase inhibitor herbicides based on human serum albumin and superoxide dismutase binding information // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2024. Vol. 309. P. 123789.
2. Chin T.E. et al. Haptens and Monoclonal Antibodies for Immunoassay of Imidazolinone Herbicides // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50, № 12. P. 3380–3389.
3. Subrahmanyam S., Piletsky S.A., Turner A.P.F. Application of Natural Receptors in Sensors and Assays // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74, № 16. P. 3942–3951.
4. Speltini A. et al. Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review // *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 974. P. 1–26.
5. Liu J. et al. Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity // *Analytica Chimica Acta*. 2004. Vol. 504, № 1. P. 185–189.
6. Gutierrez R. A.V., Hedström M., Mattiasson B. Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor // *Biotechnology Reports*. 2016. Vol. 11. P. 12–17.
7. Beloglazova N. et al. Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone // *Talanta*. 2019. Vol. 192. P. 169–174.
8. Hermanson G.T. *Bioconjugate techniques*. 3d edition. Amsterdam: Academic Press, 2013.