

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУТАНТНОЙ ФОРМЫ Д-ГЛЮКОЗА/Д-ГАЛАКТОЗА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА GGBP/H152C С ПРИСОЕДИНЕННЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ КРАСИТЕЛЕМ BADAN

© А. В. Фонин,^{1,*} Ольга В. Степаненко,¹ О. И. Поварова,¹ Е. А. Волова,^{1,2} Е. М. Филиппова,^{1,3}
Г. С. Бубликов,¹ И. М. Кузнецова,^{1,3} А. П. Демченко,⁴ К. К. Туроверов^{1,3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

² С.-Петербургский государственный университет,

³ С.-Петербургский государственный политехнический университет и

⁴ Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

* электронный адрес: alexfonin@incras.ru

Исследовано влияние различных факторов на физико-химические свойства и комплексообразование с глюкозой мутантной формы D-глюкоза/D-галактоза-связывающего белка GGBP/H152C с присоединенным к цистеиновому остатку Cys 152 сольватохромным красителем BADAN. Этот белок может рассматриваться как чувствительный элемент глюкометра. Точечная аминокислотная замена His 152 на Cys и присоединение BADAN по этому положению более чем в 8 раз снижают сродство мутантной формы GGBP/H152C к глюкозе по сравнению с белком дикого типа, что позволяет использовать эту мутантную форму для определения содержания сахара в биологических жидкостях, извлекаемых с помощью трансдермальных технологий. Достаточно быстрое комплексообразование GGBP/H152C с глюкозой (даже в растворах с вязкостью 4 сПз время образования комплекса белок—Glc не превышает 3 с) обеспечивает возможность своевременно отслеживать изменения концентрации сахара. Изменение ионной силы и pH раствора в пределах физиологического диапазона значений этих величин не оказывает заметного влияния на флуоресцентные характеристики GGBP/H152C—BADAN. В области кислых значений pH часть молекул GGBP/H152C находится в развернутом состоянии. Показано, что мутантная форма GGBP/H152C обладает относительно невысокой устойчивостью к денатурирующему воздействию гуанидингидрохлорида. Этот результат позволяет сделать вывод о необходимости поиска более стабильных белков для создания чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу.

Ключевые слова: флуоресценция, биосенсор, глюкоза, флуоресцентный краситель.

Принятые сокращения: BADAN — 6-бромацетил-2-диметиламинонафтилин, FRET — безызлучательный перенос энергии по ферстеровскому механизму, GdnHCl — гуанидингидрохлорид, GGBP — D-глюкоза/D-галактоза-связывающий белок, GGBP/H152C — мутантная форма D-глюкоза/D-галактоза-связывающего белка с заменой гистидинового остатка 152 на цистеиновый, GGBP/H152C—BADAN — белок GGBP/H152C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN, Glc — глюкоза, GGBP/H152C—BADAN—Glc — комплекс GGBP/H152C—BADAN с глюкозой.

В течение последних десятилетий наблюдается устойчивый рост числа людей, больных диабетом. Для предотвращения неблагоприятных последствий повышения уровня сахара в крови необходим его непрерывный или достаточно регулярный контроль. В связи с этим актуальной является задача создания устройств, позволяющих непрерывно и неинвазивно измерять уровень глюкозы в крови человека (Oliver et al., 2009). Исследования в данном направлении ведутся уже более 20 лет. Создано немало коммерческих неинвазивных глюкометров, основанных на различных физических принципах, однако эту задачу вряд ли можно считать решенной. Большинство представленных в продаже приборов для непрерывного неинвазивного мониторинга сахара представляют собой подкожные электрохимические биосенсоры, действие которых основано на специфической

ферментативной реакции окисления или фосфорилирования глюкозы белком — чувствительным элементом. Основным недостатком таких сенсоров является расходуемость чувствительного элемента при взаимодействии с субстратами вследствие необратимости реакции.

Более перспективным направлением является разработка биосенсорной системы, чувствительный элемент которой представляет собой белок, реакция которого с глюкозой носит обратимый характер. Такими белками являются, например, конканавалин A и D-глюкоза/D-галактоза-связывающий белок (GGBP). Использование для этих целей GGBP перспективно, так как при связывании с глюкозой происходят значительные перестройки его третичной структуры (Amiss et al., 2007; Sakaguchi-Mikami et al., 2008; Saxl et al., 2009).

Наибольшую чувствительность биосенсорная система на основе GGBP должна иметь в области концентраций аналита, близкой по величине к константе диссоциации комплекса белок—Glc. Значение константы диссоциации комплекса GGBP—Glc (1 мкМ) (Vyas et al., 1988) значительно ниже содержания глюкозы в крови здоровых людей и лиц, больных диабетом (3—8 мМ).

Достигнуть соответствия значения константы диссоциации комплекса GGBP—Glc с концентрацией глюкозы в анализируемой среде можно двумя способами. Первый состоит в создании мутантных форм GGBP с пониженным сродством к глюкозе по сравнению с белком дикого типа. Второй — в использовании трансдермальных методов экстракции глюкозы из крови или межтканевой жидкости (обратный ионофорез, сонофорез, быстрый микрорадиализ, лазеропорация) (Oliver et al., 2009), при проведении которой происходит разбавление содержания глюкозы в извлекаемой жидкости и уменьшение его на три порядка. Это позволяет использовать в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу дикий тип GGBP или мутантную форму этого белка с близким к дикому типу сродством к глюкозе.

Одним из широко распространенных методов регистрации конформационных изменений белков является флуоресценция. Несмотря на значительные структурные изменения при взаимодействии GGBP с глюкозой, характеристики собственной УФ-флуоресценции этого белка практически не изменяются при комплексообразовании (Stepanenko et al., 2011). Таким образом, флуоресцентный ответ на связывание GGBP с глюкозой может быть получен путем регистрации либо флуоресценции связанного с белком красителя, либо изменения FRET-сигнала химерной конструкции на основе GGBP. Создано несколько серий мутантных форм GGBP с присоединенными к белку различными красителями, флуоресцирующими в видимой (Amiss et al., 2007; Khan et al., 2010) и инфракрасной (Thomas et al., 2006; Thomas et al., 2007) областях спектра, а также синтезирован ряд FRET-конструкций, основой которых являлся GGBP (Ye et al., 2003; Ge et al., 2004).

Одним из перспективных кандидатов на роль чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу является мутантная форма GGBP/H152C с точечной аминокислотной заменой гистидинового аминокислотного остатка в положении 152 на цистeinовый и присоединенным к нему флуоресцентным красителем BADAN (GGBP/H152C—BADAN) (Khan et al., 2008). Показано, что при переходе GGBP/H152C из открытой формы в закрытую наблюдается трехкратное увеличение интенсивности флуоресценции связанного с белком красителя (Khan et al., 2008; Khan et al., 2010).

Проведение продолжительных измерений содержания глюкозы в анализируемых средах можно достичь при условии высокой стабильности белка — чувствительного элемента. Одним из способов оценки стабильности белков является изучение их разворачивания под действием химического денатуранта.

Задачей настоящей работы явилось изучение влияния различных внешних условий (присутствие денатурирующих агентов, изменение значений pH, вязкости и ионной силы раствора) на флуоресцентные характеристики мутантной формы GGBP/H152C—BADAN в открытой и закрытой формах, а также исследование времени отклика регистрируемого сигнала на изменение содержания глюкозы в анализируемой среде.

Материал и методика

Использованные реагенты. D-глюкозу, ацетонитрил (Sigma, США), NaCl (Вектон, Россия), флуоресцентный краситель BADAN, сульфат хинина (AnaSpec, США), гуанидингидрохлорид (GdnHCl) (Nacalai Tesque, Япония) и глицерин (Merck, Германия) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию GdnHCl и глицерина определяли с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия). Мутантная форма D-глюкоза/D-галактоза-связывающего белка GGBP/H152C получена, выделена и очищена, как описано ранее (Stepanenko et al., 2011). Присоединение флуоресцентного красителя BADAN к GGBP/H152C осуществляли по описанной методике (Khan et al., 2010). Эксперименты выполнены при концентрации растворов белков 0.2—0.8 мг/мл. Для образования комплекса белок—лиганд в раствор белка добавляли D-глюкозу в концентрации 10—20 мМ. Измерения проводили в буферных растворах, содержащих лимонную кислоту и Na₂HPO₄ (pH 2.8, 4.2, 6.0 и 7.1), PBS (pH 7.4) и Tris-HCl (pH 7.2 и 9.6).

Флуоресцентные измерения. Флуоресцентные измерения проводили с использованием спектрофлуориметра собственного изготовления (Туроверов и др., 1998) и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия). Измерение кинетики связывания GGBP/H152C—BADAN с глюкозой (GGBP/H152C—BADAN—Glc) было выполнено с помощью аппаратуры остановленного потока MOS 450 (Bio-Logic, Франция). Собственную УФ-флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм. Флуоресценцию красителя возбуждали при длинах волн 350, 387 и 405 нм. Для характеристики положения и формы спектров собственной УФ-флуоресценции использовали параметр $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} — интенсивность флуоресценции, измеренная при длинах волн 320 и 365 нм соответственно). Спектры флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствительность установки. Квантовый выход флуоресценции BADAN определяли согласно методике, описанной ранее (Kuznetsova et al., 2012). В качестве эталона использовали раствор сульфата хинина в 0.1 М H₂SO₄. Константу диссоциации (K_d) комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc определяли, как описано в литературе (Nolting, 1999). Величину энергетического барьера между открытой и закрытой формами GGBP/H152C рассчитывали по методике Нолтинга (Nölting, 1999). Флуоресцентные измерения выполнены при 23 °C с использованием микрокювет (Helma, Германия; Varian, Австралия).

Результаты и обсуждение

Константа диссоциации комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc. Точечная аминокислотная замена гистидинового остатка 152 на цистеиновую снижает сродство GGBP к глюкозе. K_d комплекса GGBP/H152C—Glc, определенная с помощью собственной УФ-флуоресценции для не связанныего с красителем белка, составляет 5.6 мкМ, что более чем в 5 раз превышает соответствующее значение для белка дикого типа. Это можно объяснить нарушением водородной связи между остатком 152 GGBP и шестым атомом молекулы глюкозы вследствие замены His152 на Cys. Показано, что присоединение BADAN к GGBP/H152C также способст-

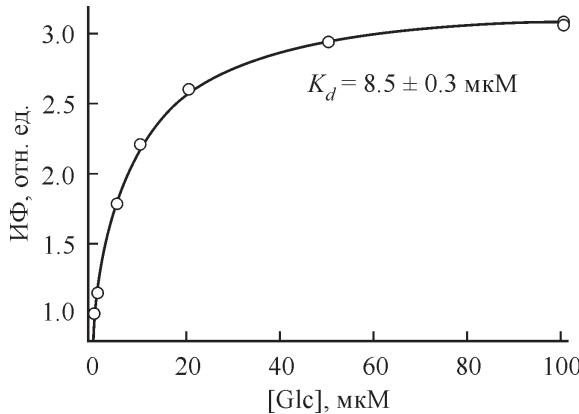


Рис. 1. Определение константы диссоциации (K_d) комплекса GGBP/H152C—BADAN с глюкозой (Glc).

ИФ — интенсивность флуоресценции. Длина волны возбуждения 387 нм, регистрация — 545 нм.

вует некоторому увеличению K_d комплекса белок—Glc. K_d комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc, определенная по изменению интенсивности флуоресценции BADAN, равна 8.5 мкМ (рис. 1). Уменьшение сродства GGBP/H152C к глюкозе при связывании BADAN может быть обусловлено тем, что краситель нарушает конформационное соответствие между активным центром белка и молекулой глюкозы. Тем не менее константа диссоциации комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc значительно ниже содержания глюкозы в крови и межтканевой жидкости здоровых людей и лиц, больных диабетом. Поэтому мутантная форма GGBP/H152C—BADAN может быть использована в качестве чувствительного на глюкозу элемента биосенсорной системы лишь для определения содержания сахара в биологических жидкостях, экстрагируемых с помощью трансдермальных технологий.

Кинетика образования комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc. Любая биосенсорная система

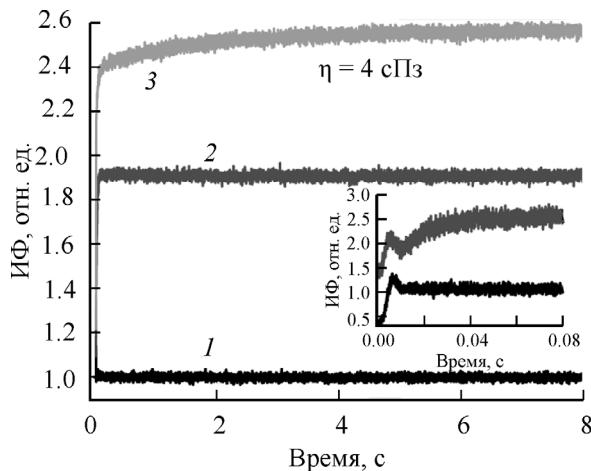


Рис. 2. Кинетика связывания GGBP/H152C—BADAN с Glc в растворах с различной вязкостью.

Длина волны возбуждения 405 нм. Кривая 1 — контроль, кривая 2 — связывание GGBP/H152C—BADAN с Glc в растворе PBS, кривая 3 — связывание GGBP/H152C—BADAN с Glc в смеси PBS и глицерина (вязкость итогового раствора составляла 4 сПз). Вставка: кинетика связывания GGBP/H152C—BADAN с Glc в растворе PBS. Чёрная кривая — контроль, серая кривая — связывание GGBP/H152C—BADAN с Glc в растворе PBS.

должна достаточно быстро реагировать на изменение содержания аналита в исследуемой среде. В связи с этим была исследована кинетика изменения интенсивности флуоресценции присоединенного к GGBP/H152C красителя BADAN при введении в анализируемый раствор глюкозы (рис. 2). Показано, что при добавлении сахара в исследуемый раствор интенсивность флуоресценции BADAN, присоединенного к белку в открытой форме, всего за 0.08 с достигает значения интенсивности флуоресценции красителя в составе комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc. Величина энергетического барьера между апо- и холоформой GGBP/H152C, соответствующая такому времени образования комплекса белок—Glc, составляет 15.9 ккал/моль. Известно, что на скорость комплексообразования лиганда с рецептором может оказывать влияние вязкость среды (Bongrand, 1999). Показано, что образование комплекса белок—Glc в растворах с вязкостью, соответствующей значению этого параметра в крови человека (4 сПз) (Dintenfass, 1985), также происходит достаточно быстро — за 3 с (рис. 2). Это позволяет использовать мутантную форму GGBP/H152C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN для определения концентрации глюкозы в вязких средах.

Влияние вязкости раствора на флуоресцентные характеристики GGBP/H152C—BADAN. BADAN является сольватохромным красителем (Owenius, 1999), флуоресцентные характеристики которого по определению зависят от полярности среды (Demchenko et al., 2013). Действительно, нами показано, что изменение полярности среды оказывает существенное влияние на квантовый выход (q) флуоресценции свободного красителя. При переходе из полярного окружения (смешанный растворитель ацетонитрил/вода при соотношении 1 : 100) в неполярное (ацетонитрил) q возрастает в 1.7 раза.

Оказалось, что ограничение подвижности красителя также может оказывать значительное влияние на квантовый выход флуоресценции BADAN. Показано, что при связывании красителя с GGBP/H152C квантовый выход флуоресценции BADAN возрастает приблизительно в 21 раз по сравнению с квантовым выходом свободного красителя в смешанном растворителе (ацетонитрил с водой). Это может свидетельствовать о том, что существует механизм безызлучательной дезактивации возбужденного состояния красителя, связанный с подвижностью фрагментов молекулы BADAN друг относительно друга.

Согласно уравнению Дебая—Стокса—Эйнштейна (Loutfy et al., 1982), константа скорости безызлучательной дезактивации возбужденного состояния молекулы флуорофора, сопряженная с изменением подвижности частей молекулы друг относительно друга, пропорциональна отношению температуры растворителя (T) к его вязкости (η):

$$k_\varphi \sim \frac{T}{\eta}. \quad (1)$$

Предположив, что сумма констант скоростей безызлучательной дезактивации возбужденного состояния (k_{nf}) BADAN описывается соотношением

$$\sum k_{nf} = k_\varphi + k_{\varphi 0}, \quad (2)$$

где k_φ — константа скорости безызлучательной дезактивации возбужденного состояния красителя, определяе-

мая выражением (1), k_{ϕ_0} — константа скорости безызлучательной дезактивации возбужденного состояния BADAN, когда $k_{\phi}=0$, выражение для квантового выхода флуоресценции красителя примет следующий вид:

$$q = \frac{k_f}{k_f + k_{\phi} + k_{\phi_0}}, \quad (3)$$

где k_f — константа скорости излучательной дезактивации возбужденного состояния красителя.

После проведения ряда преобразований уравнение (3) можно записать следующим образом:

$$\frac{1}{q} = 1 + a + b \frac{T}{\eta}, \quad (4)$$

где $a = \frac{k_{\phi_0}}{k_f} = (1/q - 1)$ при $T \rightarrow 0$ и $\eta \rightarrow \infty$, b — коэффициент пропорциональности.

Нами показано, что зависимость квантового выхода флуоресценции от вязкости раствора водно-глицериновой смеси, представленная в координатах $1/q - 1$ для BADAN, связанного с открытой формой GGBP/H152C, от отношения T/η имеет линейный характер (рис. 3). Это подтверждает предположение о существовании механизма безызлучательной дезактивации возбужденного состояния красителя, связанного с подвижностью фрагментов молекулы BADAN друг относительно друга.

Зависимость $1/q - 1$ флуоресценции BADAN в составе комплекса GGBP/H152C с глюкозой от отношения T/η представляет собой кривую с насыщением (рис. 3). Повидимому, такой вид зависимости обусловлен тем, что комплексообразование GGBP/H152C с лигандом приводит к уменьшению доступности BADAN молекулам растворителя.

Разворачивание GGBP/H152C—BADAN в открытой и закрытой формах под действием химического денатуранта GdnHCl. Стабильность мутантной формы GGBP/H152C была оценена с помощью исследования разворачивания GGBP/H152C—BADAN в открытой и закрытой формах под действием химического денатуранта GdnHCl.

Совокупный анализ данных флуоресценции связанного с белком красителя (рис. 4, а) и собственной УФ-флуоресценции GGBP/H152C (рис. 4, б) показал, что мутантная форма GGBP/H152C как в связанном, так и в не связанном с красителем состоянии начинает разворачиваться уже при небольших концентрациях денатуранта (0.3 M GdnHCl), т. е. имеет относительно невысокую устойчивость к денатурирующим воздействиям.

Наблюдаемый рост интенсивности флуоресценции присоединенного к белку красителя в диапазоне концентраций GdnHCl от 0.3 до 0.6 M, возможно, обусловлен некоторым сближением N- и C-доменов GGBP/H152C по мере разворачивания белка, из-за чего окружение BADAN становится более неполярным и плотно упакованым. Выраженный максимум зависимости интенсивности флуоресценции красителя от концентрации денатуранта (около 0.6 M GdnHCl — середина перехода между нативным и развернутым состояниями, согласно данным собственной УФ-флуоресценции) свидетельствует о резком изменении микроокружения BADAN в этой области GdnHCl. Ранее с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии было показано (Stepanenko

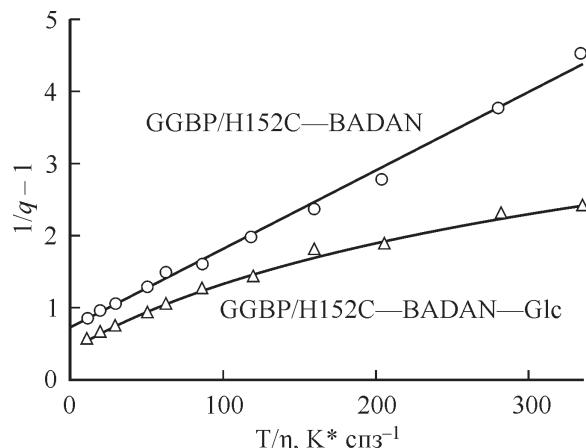


Рис. 3. Влияние вязкости и температуры растворителя на квантовый выход (q) флуоресценции GGBP/H152C—BADAN в открытой (кружки) и закрытой (треугольники) формах.

Длина волны возбуждения 387 нм.

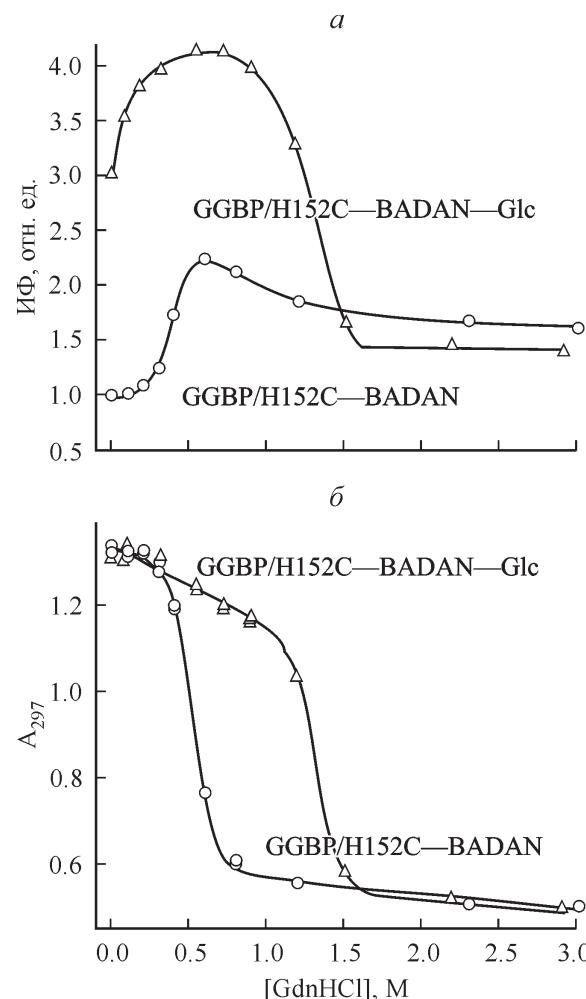


Рис. 4. Разворачивание GGBP/H152C—BADAN в открытой (кружки) и в закрытой (треугольники) формах под действием GdnHCl.

а — зависимость интенсивности флуоресценции (ИФ) (длина волны возбуждения 387 нм, регистрация — 545 нм) от концентрации GdnHCl; *б* — зависимость параметра $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} — интенсивность флуоресценции, измеренная при длинах волн 320 и 365 нм соответственно) от концентрации GdnHCl. Длина волны возбуждения 297 нм.

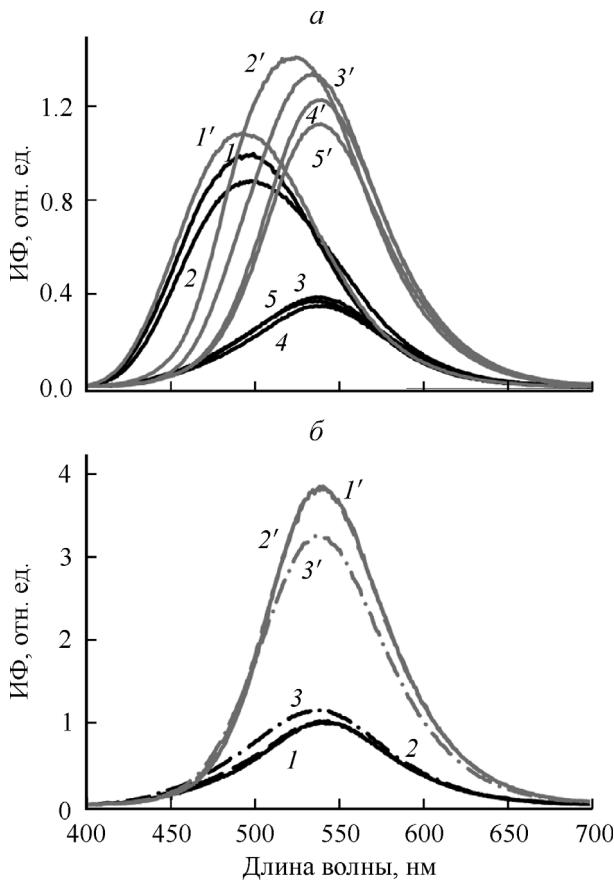


Рис. 5. Влияние рН (а) и ионной силы (б) раствора на флуоресцентные характеристики GGBP/H152C—BADAN в открытой (кривые, обозначенные цифрами) и закрытой (кривые, обозначенные цифрами со штрихом) формах.

Значения рН раствора (а) для кривых 1—5 — 2.8, 4.2, 6.4, 7.4 и 9.6 соответственно. б — спектры флуоресценции в растворах с различной ионной силой; кривые 1 и 1' — PBS, кривые 2 и 2' — 0.8 М NaCl, кривые 3 и 3' — 2.5 М NaCl. Длина волны возбуждения 387 нм.

et al., 2011), что при денатурации GGBP под действием нагревания домены этого белка разворачиваются не одновременно. Возможно, резкое изменение микроокружения BADAN около середины перехода между нативным и развернутым состояниями GGBP/H152C обусловлено разделением N- и C- доменов этого белка при его денатурации под действием GdnHCl.

Показано, что комплексообразование с глюкозой приводит к значительной стабилизации структуры GGBP/H152C: середина перехода между нативным и развернутым состояниями GGBP/H152C—BADAN—Glc сдвинута на 0.7 М в область больших концентраций GdnHCl по сравнению с открытой формой белка (рис. 4, б).

При разворачивании комплекса GGBP/H152C—BADAN—Glc под действием GdnHCl наблюдается плавное увеличение интенсивности флуоресценции BADAN до значений концентрации GdnHCl около 0.5 М (рис. 4, а). В области 0.5—1 М GdnHCl кривая зависимости интенсивности флуоресценции GGBP/H152C—BADAN—Glc от концентрации денатуранта выходит на плато (соответствует началу плавления GGBP/H152C—BADAN—Glc по данным собственной УФ-флуоресценции). При дальнейшем увеличении концентрации GdnHCl наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции красителя.

Такой характер зависимости интенсивности флуоресценции BADAN от концентрации денатуранта, по-видимому, является следствием закрытой конформации N- и C-доменов GGBP/H152C—BADAN в составе комплекса этого белка с глюкозой. Микроокружение BADAN в этом случае более гидрофобно и плотно упаковано по сравнению с окружением красителя, присоединенного к GGBP/H152C в открытой форме.

При денатурации GGBP/H152C—BADAN под действием GdnHCl как в открытой, так и в закрытой форме наблюдается незначительный сдвиг в коротковолновую область максимума спектра флуоресценции красителя (даные не представлены). Это также свидетельствует об уменьшении доступности BADAN растворителю при разворачивании белка в апо- и холоформе.

Зависимость флуоресцентных характеристик GGBP/H152C—BADAN в открытой и закрытой формах от рН и ионной силы раствора. При уменьшении рН раствора GGBP/H152C теряет нативную структуру: наблюдаются уменьшение интенсивности собственной УФ-флуоресценции, рост интенсивности флуоресценции связанного с белком красителя и сдвиг максимума спектра флуоресценции BADAN в коротковолновую область по сравнению с соответствующими значениями в растворах с нейтральными рН (рис. 5, а). Тем не менее, согласно данным флуоресценции BADAN (увеличение интенсивности флуоресценции красителя при комплексообразовании), способность GGBP/H152C связывать Glc сохраняется до значений рН около 4.2. При дальнейшем закислении среды взаимодействие с Glc не приводит к заметным изменениям в спектрах флуоресценции GGBP/H152C—BADAN. Это свидетельствует о том, что в этих условиях GGBP/H152C теряет способность связывать Glc.

При переходе значений рН из нейтральной области в щелочную не наблюдается значительных изменений в собственной УФ-флуоресценции GGBP/H152C и флуоресценции присоединенного к белку красителя (рис. 5, а). Способность GGBP/H152C—BADAN к связыванию Glc при этом сохраняется.

Анализ влияния рН раствора на флуоресцентные характеристики GGBP/H152C—BADAN в открытой и закрытой формах подтверждает относительно невысокую стабильность GGBP/H152C, так как переход из нейтральной в кислую область рН способствует потере этим белком своей нативной структуры.

Изменение ионной силы раствора не оказывает заметного влияния на флуоресцентные характеристики белка и связанного с GGBP/H152C красителя (рис. 5, б). Незначительное уменьшение собственной УФ-флуоресценции GGBP/H152C и увеличение интенсивности флуоресценции BADAN в составе белка в открытой форме по сравнению с соответствующими значениями в растворе PBS наблюдаются лишь при концентрации NaCl около 2.5 М. Белок при этом не теряет способности связывать Glc. Это свидетельствует о том, что изменение ионной силы раствора оказывает незначительное влияние на пространственную структуру GGBP/H152C.

Полученные в результате проведенных исследований данные позволяют заключить, что мутантная форма GGBP/H152C—BADAN может быть использована в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на Glc для определения концентрации сахара в биологических жидкостях, извлекаемых с помощью трансдермальных технологий. Этот белок имеет относительно не-

высокую устойчивость к внешним воздействиям и может быть использован в этом качестве в средах с малоизменяющимися характеристиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (Соглашение № 8830), Совета по грантам президента РФ (стипендии СП-2390.2012.4 и СП-563.2012.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-31708 мол_а).

Список литературы

- Turoverov K. K., Biktashov A. G., Dorofeuk A. V., Kuznetsova I. M. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 : 806—817 (*Turoverov K. K., Biktashov A. G., Dorofeuk A. V., Kuznetsova I. M. 1998. A complex of apparatus and programs for the measurement of spectral, polarization and kinetic characteristics of fluorescence in solution. Tsitologiya. 40 : 806—817.*)
- Amiss T. J., Sherman D. B., Nycz C. M., Andaluz S. A., Pittner J. B. 2007. Engineering and rapid selection of a low-affinity glucose/galactose-binding protein for a glucose biosensor. *Protein Sci.* 16 : 2350—2359.
- Bongrand P. 1999. Ligand — receptor interaction. *Rep. Prog. Phys.* 62 : 921—968.
- Demchenko A. P., Tang K.-C., Chou P.-T. 2013. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization. *Chem. Soc. Rev.* 42 : 1379—1408.
- Dintenfass L. 1985. Blood viscosity. Lancaster: MTP Press. 482 p.
- Ge X., Tolosa L., Rao G. 2004. Dual-labeled glucose binding protein for ratiometric measurements of glucose. *Anal. Chem.* 76 : 1403—1410.
- Khan F., Gnudi L., Pickup J.C. 2008. Fluorescence-based sensing of glucose using engineered glucose/galactose binding protein: a comparison of fluorescence resonance energy transfer and environmentally sensitive dye labelling strategies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 : 102—106.
- Khan F., Saxl T., Pickup J.C. 2010. Fluorescence intensity and lifetime-based glucose sensing using an engineered high-Kd mutant of glucose/galactose-binding protein. *Anal. Biochem.* 399 : 39—43.
- Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Povarova O. I., Turoverov K. K. 2012. Reevaluation of ANS binding to human and bovine serum albumins: key role of equilibrium microdialysis in ligand-receptor binding characterization. *PLoS ONE.* 7 : e40845.
- Loufty R. O., Arnold B. A. 1982. Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors. *J. Phys. Chem.* 86 : 4205—4211.
- Nöltig B. 1999. Protein folding kinetics. Berlin: Springer. 222 p.
- Oliver N. S., Toumazou C., Cass A. E. G., Johnston D. G. 2009. Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabetic Medicine* 26 : 197—210.
- Owenius R., Österlund M., Lindgren M., Svensson M., Olsson O. H., Persson E., Freskgård P. O., Carlsson U. 1999. Properties of spin and fluorescent labels at a receptor-ligand interface. *Biophys. J.* 77 : 2237—2250.
- Sakaguchi-Mikami A., Taneoka A., Yamoto R., Ferri S., Soode K. 2008. Engineering of ligand specificity of periplasmic binding protein for glucose sensing. *Biotechnol. Lett.* 30 : 1453—1460.
- Saxl T., Khan F., Matthews D. R., Zhi Z.-L., Rolinski O., Amer-Beg S., Pickup J. C. 2009. Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging of nano-engineered glucose sensor microcapsules based on glucose/galactose-binding protein. *Biosens. Bioelectron.* 24 : 3229—3234.
- Stepanenko Olga V., Fonin A. V., Stepanenko Olesya V., Morozova K. S., Verkhusha V. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Staiano M., D'Auria S. J. 2011. New insight into protein—ligand interactions. The case of the d-galactose/d-glucose-binding protein from *Escherichia coli*. *J. Phys. Chem. B.* 115 : 2765—2773.
- Stepanenko Olga V., Fonin A. V., Stepanenko Olesya V., Morozova K. S., Verkhusha V. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Staiano M., D'Auria S. J. 2011. New insight in protein—ligand interactions. 2. Stability and properties of two mutant forms of the D-galactose/D-glucose-binding protein from *E. coli*. *J. Phys. Chem. B.* 115 : 9022—9032.
- Thomas K. J., Sherman D. B., Amiss T. J., Andaluz S. A., Pittner J. B. 2006. A longwavelength fluorescent glucose biosensor based on bioconjugates of galactose/glucose binding protein and Nile red derivatives. *Diabetes Technol. Therapeutics.* 8 : 261—268.
- Thomas K. J., Sherman D. B., Amiss T. J., Andaluz S. A., Pittner J. B. 2007. Synthesis and biosensor performance of a near-IR thiol-reactive fluorophore based on benzothiazolium squaraine. *Bioconjug. Chem.* 18 : 1841—1846.
- Vyas N. K., Vyas M. N., Quiocho F. A. 1988. Sugar and signal-transducer binding sites of the *Escherichia coli* galactose chemoreceptor protein. *Science.* 242 : 1290—1295.
- Ye K., Schultz J. S. 2003. Genetic engineering of an allosterically based glucose indicator protein for continuous glucose monitoring by fluorescence resonance energy transfer. *Anal. Chem.* 75 : 3451—3459.

Поступила 17 IX 2013

PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF THE MUTANT (PROTEIN) FORM OF D-GLUCOSE/D-GALACTOSE-BINDING PROTEIN GGBP/H152C WITH AN ATTACHED FLUORESCENT DYE BADAN

A. V. Fonin,^{1,*} Olga V. Stepanenko,¹ O. I. Povarova,¹ E. A. Volova,^{1,2} E. M. Philippova,^{1,3}
G. S. Bublikov,¹ I. M. Kuznetsova,^{1,3} A. P. Demchenko,⁴ K. K. Turoverov^{1,3}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² St. Petersburg State University,

³ St. Petersburg State Polytechnical University

and ⁴ Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev;

* e-mail: alexfonin@incras.ru

The influence of various factors on the physico-chemical characteristics and complexation of glucose with a mutant form of D-glucose/D-galactose-binding protein which can be regarded as a sensor of the glucometer, namely the protein GGBP/H152C with solvatochromic dye BADAN attached to the cysteine residue Cys 152, has been investigated. The point mutation His152Cys and attaching BADAN reduced the affinity of the mutant form GGBP/H152C to glucose more than 8-fold compared to the wild type protein. This allows using this mutant for the determination of sugar content in biological fluids extracted by transdermal technologies. Suffici-

ently rapid complexation of GGBP/H152C with glucose (the time of protein—glucose complex formation is not more than three seconds even in solutions with a viscosity of 4 cP) provides timely monitoring changes in the concentration of sugar. The changes of ionic strength and pH within the physiological range of values of these variables do not have significant influence on fluorescent characteristics of GGBP/H152C—BADAN. At acidic pH, (3.17) some of the molecules GGBP/H152C is in the unfolded state. It has been shown that mutant form GGBP/H152C has relatively low resistance to guanidine hydrochloride denaturing effects. This result indicates the need for more stable proteins to create a sensor for glucose biosensor system.

Key words: fluorescence, biosensor, glucose, fluorescent dye.